UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

KATIA COLOMBO MARCHI

**Participação da NADPH oxidase no aumento da pressão arterial induzida
pelo consumo crônico de etanol: avaliação do estresse oxidativo vascular**

Ribeirão Preto
2015

KATIA COLOMBO MARCHI

**Participação da NADPH oxidase no aumento da pressão arterial induzida
pelo consumo crônico de etanol: avaliação do estresse oxidativo vascular**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção de título de doutor.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Carlos Renato Tirapelli

Ribeirão Preto

2015

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.

Marchi, Katia Colombo

Participação da NADPH oxidase no aumento da pressão arterial induzida pelo consumo crônico de etanol: avaliação do estresse oxidativo vascular. Ribeirão Preto, 2015.

115 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. NADPH oxidase. 2. Etanol. 3. Estresse oxidativo.
4. Ânion superóxido. 5. Hipertensão. 6. Apocinina

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autor: Katia Colombo Marchi

Título: Participação da NADPH oxidase no aumento da pressão arterial induzida pelo consumo crônico de etanol: avaliação do estresse oxidativo vascular.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção de título de doutor

Área de concentração: Farmacologia

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. (a) Dr. (a): _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. (a) Dr. (a): _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. (a) Dr. (a): _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. (a) Dr. (a): _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. (a) Dr. (a): _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Aos meus pais, meu irmão e meu noivo.
Minha família, minha vida, amor verdadeiro.

Agradecimentos

Agradeço a Deus, que sempre me deu força, coragem, amor e muita fé para conseguir alcançar minhas metas trilhando sempre o caminho da felicidade e da justiça.

Aos meus pais, que continuam cuidando de mim, me ensinando o valor do respeito ao próximo e me dando discernimento para enfrentar os obstáculos da vida.

Ao meu noivo, minha fonte de força. Me mostra diariamente a importância do amor em tudo o que desenvolvemos.

Ao professor Carlos Renato Tirapelli, por todas as oportunidades concedidas, desde a iniciação científica. Muito me ensinou, contribuindo para meu crescimento profissional.

Aos professores membros da banca examinadora Dr. José Eduardo Tanus dos Santos, Dr. Fernando Silva Carneiro, Dra. Camila de Moraes e Dr. Gerson Jhonatan Rodrigues por toda atenção e disposição.

Aos amigos de laboratório, Janaína, Letícia, Ulisses, Stéfani, Patrícia e Carla por todo o apoio desde o começo.

À Natália e Gabriel, por todo apoio, conversas e carinho.

Agradeço o companheirismo de minha amiga Joice, por todas as conversas, risadas, brigas e ensinamentos. Simplesmente foi essencial nesta caminhada e continuará para sempre.

À querida amiga-anjo Ana Paula, por toda a paz, religiosidade e amor que transmite não só a mim, mas todos à sua volta. Amizade para o resto da vida.

À Soninha, por toda ajuda em todos estes anos de doutorado e principalmente por me apresentar o trabalho de iconografia e trazer Nossa Senhora do Perpétuo Socorro para mais perto de minha vida.

À professora Evelin Capellari e ao Marcelo Eduardo Batalhão, por todo o apoio e disponibilidade.

À professora Cláudia Maria Padovan, pela disponibilidade do biotério para o tratamento dos animais.

Ao professor Bruno Spinosa pela realização das dosagens de etanol em seu laboratório.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão da bolsa de doutorado e pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

“Deus antes de tudo”

Robson de Oliveira Pereira

Resumo

Marchi, K.C. **Participação da NADPH oxidase no aumento da pressão arterial induzida pelo consumo crônico de etanol: avaliação do estresse oxidativo vascular**. 2015. 115f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

O consumo crônico de etanol acarreta alterações significativas das funções cardíaca e circulatória, figurando como um importante fator de risco no desenvolvimento de doenças cardiovasculares, como por exemplo a hipertensão arterial. O passo inicial para a disfunção cardiovascular associada ao etanol envolve a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e redução da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO), sendo esse processo mediado pela enzima nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidase. Baseado nestas observações, a hipótese do estudo é a de que o consumo de etanol aumente a pressão arterial, a geração de ERO e induza a ativação de vias de sinalização *redox* sensíveis na vasculatura via NADPH oxidase. Portanto, o objetivo desse estudo foi investigar a participação da NADPH no aumento da pressão arterial e estresse oxidativo vascular induzidos pelo consumo crônico de etanol através de sua inibição pela apocinina. O trabalho demonstrou pela primeira vez o envolvimento do estresse oxidativo via ERO geradas pela NADPH oxidase no aumento da pressão arterial induzida pelo consumo crônico de etanol. Houve aumento da contração induzida por fenilefrina em anéis de aorta com e sem endotélio de animais tratados com etanol e foi demonstrada a participação das ERO geradas pela NADPH oxidase nesta resposta, uma vez que o tratamento com apocinina promoveu diminuição da contração observada. O tratamento com etanol aumentou a geração de ERO em tecido aórtico via NADPH oxidase, reduziu a biodisponibilidade de NO plasmático e tecidual e promoveu peroxidação lipídica, visto pela elevação dos níveis de TBARS. Também foi demonstrado que a enzima NADPH oxidase está envolvida no aumento da expressão protéica da PKC δ e SAPK/JNK induzido pelo etanol, e que o tratamento com etanol é capaz de diminuir a atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) e aumentar a expressão protéica especificamente da SOD2, possível resposta adaptativa ao aumento de geração de O_2^- via NADPH oxidase pelo etanol. Houve aumento da expressão protéica da nNOS em aorta de animais tratados com etanol, sendo esta, uma possível resposta adaptativa intrínseca às alterações promovidas pelo aumento da pressão arterial nestes animais. O tratamento com etanol não alterou os níveis aórticos de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), glutathiona reduzida (GSH) e atividades enzimáticas da xantina oxidase (XO), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx). Além disso, a partir da avaliação da translocação citosol/membrana das subunidades organizadoras p47phox e Nox *organizer* 1 (Noxo1) e expressão protéica das subunidades catalíticas da NADPH oxidase, Nox1, Nox2 e Nox4, foi possível concluir que o aumento da expressão da Nox1 possui importante papel na modulação da geração de ERO pelo etanol, podendo participar do aumento da pressão arterial e estresse oxidativo sistêmico e vascular gerados. Portanto, a partir dos resultados obtidos, o estudo demonstrou que o consumo crônico de etanol induz o aumento da produção de ERO, resposta implicada no aumento da pressão arterial observado nos animais tratados com etanol. Além disso, o trabalho evidencia a participação da enzima Nox1/NADPH oxidase neste processo, uma vez que houve aumento da expressão protéica dessa subunidade catalítica na aorta dos animais tratados com etanol.

Palavras-chave: NADPH oxidase, etanol, estresse oxidativo, ânion superóxido, hipertensão, apocinina.

Abstract

Marchi, K.C. **Role of NADPH oxidase in increased blood pressure induced by chronic ethanol consumption: evaluation of vascular oxidative stress.** 2015. 115f. Thesis (PhD degree) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Chronic ethanol consumption results in significant alterations in cardiac and circulatory functions, appearing as an important risk factor responsible for cardiovascular diseases such as hypertension. The initial step for cardiovascular dysfunction associated with ethanol consumption involves the generation of reactive oxygen species (ROS) and reduced bioavailability of nitric oxide (NO), processes mediated by the enzyme nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase. Based on the mentioned observations we hypothesized that ethanol consumption increases blood pressure, ROS generation and induces activation of redox-sensitive signaling pathways in the vasculature through NADPH oxidase. Thus, here we investigated the contribution of NADPH oxidase in chronic ethanol consumption-induced hypertension and vascular oxidative stress through its inhibition by apocynin. This study demonstrated for the first time the involvement of oxidative stress via ROS derived from NADPH oxidase in increased blood pressure induced by chronic ethanol intake. The increased contractility of endothelium-intact and endothelium-denuded aortic rings from ethanol-treated rats to phenylephrine was prevented by apocynin. Ethanol consumption increased systemic and vascular oxidative stress and apocynin prevented these responses. The decrease on plasma and vascular nitrate/nitrite (NOx) levels induced by ethanol were not prevented by apocynin. Treatment with ethanol did not affect aortic levels of hydrogen peroxide (H₂O₂) and reduced glutathione (GSH) as well as the activity of xanthine oxidase (XO), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx). Ethanol-induced increased protein expression of Nox1, PKC δ , nNOS, SAPK/JNK and SOD2 in the rat aorta was prevented by apocynin. No difference on the aortic expression of Nox2, Nox4, p47phox, Nox organizer 1 (Noxo1), eNOS and iNOS was detected after treatment with ethanol. Ethanol treatment did not alter the phosphorylation of SAPK/JNK, p38MAPK, ERK1/2, c-Src, Rac1 or PKC δ . The major new finding of our study is that the increased vascular generation of reactive oxygen species (ROS) induced by ethanol is related to the increased vascular Nox1/NADPH oxidase expression. This mechanism is involved on the vascular dysfunction and hypertension induced by ethanol. Additionally, we conclude that ethanol consumption induces the expression of different proteins that regulate vascular contraction and growth and that NADPH oxidase-derived ROS play a role in such response.

Keywords: NADPH oxidase, ethanol, oxidative stress, superoxide anion, hypertension, apocynin.

Lista de figuras

Figura 1. Esquema dos efeitos intracelulares induzidos pela ativação da NADPH no sistema cardiovascular.....	28
Figura 2. Média do peso dos animais durante o período de tratamento	48
Figura3. Consumo de ração entre os animais durante o período de tratamento.....	49
Figura 4. Ingestão líquida entre os animais durante o período de tratamento	50
Figura 5. Participação da NADPH oxidase nos efeitos do tratamento crônico com etanol sobre a pressão arterial sistólica (PAS).....	51
Figura 6. Participação da NADPH oxidase nos efeitos do tratamento crônico com etanol na resposta contrátil induzida por fenilefrina em anéis de aorta com e sem endotélio	52
Figura 7. Participação da NADPH oxidase nos efeitos do tratamento crônico com etanol na resposta contrátil induzida por KCl em anéis de aorta com e sem endotélio	54
Figura 8. Participação da NADPH oxidase nos efeitos do tratamento crônico com etanol na resposta de relaxamento induzida pela acetilcolina e NPS em anéis de aorta torácica de rato	55
Figura 9. Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a produção de O_2^- e H_2O_2 em aorta de ratos	56
Figura 10. Visualização da geração de O_2^- e H_2O_2 em cortes de tecido aórtico detectados pelas sondas fluorescentes DHE e DCFH-DA, respectivamente	57
Figura 11. Participação da NADPH oxidase nos efeitos do tratamento crônico com etanol sobre os níveis de TBARS em plasma e aorta de ratos	58
Figura 12. Participação da NADPH oxidase nos efeitos do tratamento crônico com etanol sobre os níveis nitrato e nitrito no plasma e aorta de ratos.....	59
Figura 13. Participação da NADPH oxidase nos efeitos do tratamento crônico com etanol sobre a atividade da XO em aorta de ratos	60
Figura 14. Participação da NADPH oxidase nos efeitos do tratamento crônico com etanol sobre a atividade da SOD em plasma e aorta de ratos.....	61
Figura 15. Participação da NADPH oxidase nos efeitos do tratamento crônico com etanol sobre a atividade da CAT em plasma e aorta de ratos.....	62
Figura 16. Participação da NADPH oxidase nos efeitos do tratamento crônico com etanol sobre a atividade da GPx em aorta de ratos.....	63
Figura 17. Participação da NADPH oxidase nos efeitos do tratamento crônico com etanol sobre os níveis de GSH em plasma (A) e aorta (B) de ratos	64

Figura 18. Participação da NADPH oxidase nos efeitos do tratamento crônico com etanol sobre a capacidade antioxidante total	65
Figura 19. Participação da NADPH oxidase nos efeitos do tratamento crônico com etanol sobre a expressão da Nox1, Nox2, Nox4, p47 phox e Noxo1 em artéria aorta de rato	67
Figura 20. Participação da NADPH oxidase nos efeitos do tratamento crônico com etanol sobre a expressão e fosforilação da PKC δ , c-Src e Rac1 em artéria aorta de rato	69
Figura 21. Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a translocação da p47phox e Noxo1 em artéria aorta de rato	70
Figura 22. Participação da NADPH oxidase nos efeitos do tratamento crônico com etanol sobre a expressão protéica de MAPK em artéria aorta de rato	71
Figura 23. Participação da NADPH oxidase nos efeitos do tratamento crônico com etanol sobre a fosforilação de MAPK em artéria aorta de rato.....	72
Figura 24. Participação da NADPH oxidase nos efeitos do tratamento crônico com etanol sobre a expressão e fosforilação da Akt em artéria aorta de ratos.....	73
Figura 25. Participação da NADPH oxidase nos efeitos do tratamento crônico com etanol sobre a expressão da nNOS, iNOS e eNOS em artéria aorta de rato	74
Figura 26. Participação da NADPH oxidase nos efeitos do tratamento crônico com etanol sobre a expressão da SOD1, SOD2 e SOD3 em artéria aorta de rato	75

Lista de Tabelas

Tabela 1. Anticorpos primários e secundários, com suas respectivas diluições, utilizados para realização de Western Immunoblotting.....	44
Tabela 2. Valores de Emax (mN) e pD ₂ calculados a partir de curvas concentração-resposta para fenilefrina em preparações isoladas de aorta torácica com e sem endotélio	53
Tabela 3. Valores de Emax (mN) e pD ₂ calculados a partir de curvas concentração-resposta para KCl em preparações isoladas de aorta torácica com e sem endotélio	54
Tabela 4. Valores de Emax (% de relaxamento) e pD ₂ calculados a partir de curvas concentração-resposta para acetilcolina ou nitroprussiato de sódio em anéis de aorta torácica com endotélio ou sem endotélio, respectivamente.....	55

Lista de abreviaturas e siglas

ADH	enzima álcool desidrogenase;
CAT	catalase;
CYP2E1	enzimas do citocromo P450;
COX	enzima ciclooxygenase;
DCFH-DA	sonda 2',7'- diacetato de diclorofluoresceína;
DHE	sonda dihidroetidina;
EGF	fator de crescimento epidermal;
eNOS	óxido nítrico sintase endotelial;
ERO	espécies reativas de oxigênio;
ERK1/2	quinases reguladas por sinal extracelular;
GPx	glutathione peroxidase;
GR	glutathione reductase;
GSH	glutathione reduzida;
GSSG	glutathione oxidada;
H₂O₂	peróxido de hidrogênio;
iNOS	óxido nítrico sintase indutível;
MAPK	proteínas quinase ativadas por mitógenos;
MCP-1	proteína quimiotática de monócitos 1;
MDA	malondialdeído;
MKP-1	proteína quinase fosfatase-1;
MMPs	metaloproteinases da matriz;
NADPH oxidase	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato;
NO	óxido nítrico;
NOS	óxido nítrico sintase;
nNOS	óxido nítrico sintase neuronal;
NO_x	níveis nitrato/nitrito;
Noxa 1	Nox <i>activator</i> 1;
Noxo 1	Nox <i>organizer</i> 1;
O₂⁻	superóxido;
-OH	radical hidroxila;
ONOO⁻	peroxinitrito;
PI3K	fosfatidilinositol-3-quinase;
PKB	proteína quinase B;
PKC	proteína quinase C;
SAPK/JNK	protein quinase ativada por estresse;

SOD	superóxido dismutase;
TBARS	substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico;
TNF-α	fator de necrose tumoral;
VSMC	células musculares lisas vasculares;
VCAM	molécula de adesão celular vascular;
XO	xantina oxidase.

Sumário

1 INTRODUÇÃO	23
2 OBJETIVO	33
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
3.1 Animais	35
3.2 Grupos experimentais.....	35
3.3 Medida dos níveis sanguíneos de etanol	36
3.4 Medida da pressão arterial.....	37
3.5 Detecção de O ₂ ⁻ pelo método de quimioluminescência da lucigenina em aorta	37
3.6 Avaliação dos níveis teciduais de H ₂ O ₂ em aorta.....	37
3.7 Visualização de espécies reativas de oxigênio <i>in situ</i>	38
3.8 Determinação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no plasma e tecido aórtico.....	39
3.9 Avaliação do consumo de etanol sobre os níveis de nitrato e nitrito (NOx) plasmático e tecidual	39
3.10 Determinação da atividade enzimática da Xantina Oxidase (XO) em tecido aórtico	40
3.11 Determinação da atividade enzimática da SOD no plasma e tecido aórtico	40
3.12 Determinação da atividade enzimática da catalase (CAT) no plasma e tecido aórtico	41
3.13 Determinação da atividade enzimática da Glutathione Peroxidase (GPx) no tecido aórtico	41
3.14 Determinação dos níveis de GSH (glutathione reduzida) no plasma e tecido aórtico	42
3.15 Determinação da capacidade antioxidante total no plasma	42
3.16 Western Immunoblotting.....	43
3.17 Fracionamento citosol/membrana	45
3.18 Estudo funcional da reatividade vascular em aorta	45
3.19 Análise estatística	46
4 RESULTADOS.....	48
4.1 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre o peso corporal dos animais, consumo de ração e ingestão líquida	48
4.2 Medida dos níveis de etanol (mg/dl) no sangue	51
4.3 Participação da NADPH oxidase nos efeitos do tratamento crônico com etanol sobre a pressão arterial.....	51
4.4 Participação da NADPH oxidase nos efeitos do tratamento crônico com etanol sobre a reatividade de anéis de aorta torácica.....	52
4.4.1 Participação da NADPH oxidase nos efeitos do tratamento crônico com etanol sobre a reatividade de anéis de aorta à fenilefrina	52
4.4.2 Participação da NADPH oxidase nos efeitos do tratamento crônico com etanol sobre a reatividade de anéis de aorta ao KCl	54
4.4.3 Participação da NADPH oxidase nos efeitos do tratamento crônico com etanol sobre a reatividade de anéis de aorta à acetilcolina e NPS	55
4.5 Avaliação do estresse oxidativo	56

4.5.1 Participação da NADPH oxidase nos efeitos do tratamento crônico com etanol sobre a produção de O_2^- e H_2O_2 em aorta de ratos.....	56
4.5.2 Participação da NADPH oxidase nos efeitos do tratamento crônico com etanol sobre os níveis de O_2^- e H_2O_2 em aorta de ratos	57
4.5.3 Participação da NADPH oxidase nos efeitos do tratamento crônico com etanol sobre os níveis de TBARS no plasma e aorta de ratos	58
4.5.4 Participação da NADPH oxidase nos efeitos do tratamento crônico com etanol sobre os níveis de nitrato e nitrito (NOx) plasmáticos e teciduais.....	59
4.5.5 Participação da NADPH oxidase nos efeitos do tratamento crônico com etanol sobre a atividade da Xantina Oxidase (XO) em aorta de ratos	60
4.6 Avaliação do sistema antioxidante	61
4.6.1 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a atividade enzimática da SOD no plasma e tecido aórtico	61
4.6.2 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a atividade enzimática da catalase (CAT) no plasma e tecido aórtico	62
4.6.3 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a atividade enzimática da Glutathione Peroxidase (GPx) no tecido aórtico.....	63
4.6.4 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre os níveis de glutathione reduzida (GSH) no plasma e tecido aórtico	64
4.6.5 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a capacidade antioxidante total no plasma ..	65
4.7 Avaliação da expressão protéica	66
4.7.1 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a expressão protéica da Nox1, Nox2, Nox4, p47 phox e Noxo1 em aorta de ratos	66
4.7.2 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a expressão protéica e fosforilação de proteínas envolvidas na ativação da NADPH oxidase em aorta de ratos	68
4.7.3 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre translocação do citosol para membrana em artéria aorta de rato p47phox e Noxo1	70
4.7.4 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a expressão das MAPK em aorta de ratos	71
4.7.5 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a fosforilação das MAPK em aorta de ratos	72
4.7.6 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a expressão protéica de Akt total e fosforilada em aorta de ratos	73
4.7.7 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a expressão protéica da nNOS, iNOS e eNOS em aorta de ratos	74
4.7.8 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a expressão protéica das diferentes isoformas da SOD em aorta de ratos	75
5 DISCUSSÃO	77
6 CONCLUSÃO	97
7 REFERÊNCIAS	99

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Em todo o mundo, as doenças cardiovasculares são as principais causas de morte, apesar de décadas de avanços cirúrgicos, intervencionais e farmacológicos. O aumento da pressão arterial é responsável por 12,8% das mortes, afetando um a cada três adultos com mais de 25 anos, o que equivale a aproximadamente um bilhão de pessoas (Organização Mundial da Saúde, 2013). No Brasil, estima-se que 24,3% da população adulta tenha hipertensão arterial, chegando a quase 60% em indivíduos com idade superior a 65 anos (Ministério da Saúde, 2013).

O consumo crônico de etanol acarreta alterações significativas das funções cardíaca e circulatória, figurando como um importante fator de risco no desenvolvimento de doenças cardiovasculares, como por exemplo a hipertensão arterial (para revisão ver Marchi *et al.*, 2014; Klatsky, 2015). Há um século, foi publicado estudo pioneiro que estabeleceu relação positiva entre o consumo de etanol e aumento da pressão arterial (Lian, 1915). Após aproximadamente 50 anos o assunto recebeu especial atenção e, desde então, vários estudos em diversos países mostraram aumento da prevalência de hipertensão arterial em indivíduos que consomem etanol regularmente, independentemente da raça, sexo e fatores como obesidade, consumo de sódio, tabagismo e classe socioeconômica (Clark *et al.*, 1967; Klatsky *et al.*, 1977; Chan *et al.*, 1985; MacMahon, 1987; Yoshita *et al.*, 2005; Sesso *et al.*, 2008; Skliros *et al.*, 2012).

O efeito do etanol sobre a pressão arterial está associado à quantidade ingerida desse composto. Em seres humanos, o consumo de etanol classificado como *light-moderate drinking* (consumo menor que 3 doses padrão* por dia para mulheres, 7 doses por semana e menor que 4 doses para homens, 14 por semana) está associado a efeitos de redução do risco de doenças cardiovasculares. Já o consumo excessivo ou *heavy drinking*, consiste no consumo superior ao acima citado e está associado ao aumento do risco de cardiomiopatias, arritmias, acidente vascular encefálico hemorrágico/isquêmico e hipertensão arterial (*National Institute of Alcohol*

* Uma dose equivale a 14 gramas de etanol (NIAAA, 2013), que no contexto brasileiro corresponde a 340 ml de cerveja ou 40 ml de vodka (SENAD, 2011)

Abuse and Alcoholism, 2013; Katsky, 2015). No Brasil, de acordo com estudo realizado, os dados de frequência demonstraram que 52% dos brasileiros fazem uso de bebidas alcoólicas sendo que 11% bebem todos os dias e 28% consomem bebida alcoólica de uma a quatro vezes por semana. Vale ressaltar que 9% da população apresenta dependência quanto ao uso de bebida alcoólica (SENAD, 2007).

Apesar de estar bem estabelecida a relação entre consumo crônico de etanol e a hipertensão arterial, os mecanismos envolvidos nessa resposta não são totalmente entendidos.

Nas últimas décadas vários estudos foram desenvolvidos na tentativa de compreender esses mecanismos. Como consequência, algumas teorias foram aventadas para explicar a hipertensão arterial associada ao consumo crônico de etanol. Entre os mecanismos propostos destacam-se: 1) alteração da reatividade vascular; 2) aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (ERO); 3) redução da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO).

Em relação ao mecanismo miogênico, propõe-se que o consumo de etanol induz aumento da resposta vascular a agentes vasoconstritores e redução do relaxamento a agentes vasodilatadores. Nesse sentido, Pinardi *et al.* (1992) observaram aumento da resposta contrátil à fenilefrina em aorta de ratos tratados com solução de etanol 20% durante 18 dias. Resposta semelhante foi descrita em aorta de ratos tratados com etanol por 16 semanas (Stewart e Kennedy, 1999). Artérias mesentéricas de ratos, tratados com solução de etanol 36% durante 18 semanas, apresentaram aumento da resposta contrátil à noradrenalina, como foi mostrado por Hatton *et al.* (1992). Estudo de nosso grupo de pesquisa mostrou que, em aorta de ratos, o tratamento com etanol promove aumento da resposta contrátil à fenilefrina que é independente do endotélio e envolve aumento da liberação/produção de prostanóides vasoconstritores, que regulam o aumento de influxo de Ca^{2+} do meio extracelular (Tirapelli *et al.*, 2006a). Em outro estudo, em carótida de ratos, mostramos que o tratamento crônico com etanol reduz a expressão de receptores ET_B endoteliais responsáveis pela vasodilatação, fato que leva ao aumento da resposta contrátil à endotelina-1 (Tirapelli *et al.*, 2006b). Em leito mesentérico de ratos, o tratamento com etanol

aumenta a resposta contrátil à fenilefrina, sendo essa resposta dependente do endotélio (Tirapelli *et al.*, 2008). Em relação ao relaxamento vascular, observou-se redução da resposta de relaxamento induzida pela acetilcolina e da expressão da enzima eNOS em leito mesentérico de ratos tratados com etanol, sugerindo alteração da função endotelial (Tirapelli *et al.*, 2008).

Recentemente, um rápido aumento nas investigações de todos os aspectos da geração e ação de ERO nos sistemas biológicos ocorreu, e um novo conceito integrativo vem emergindo, o qual descreve a interconexão entre disfunção metabólica, inflamação e estresse oxidativo, convergindo para as disfunções vasculares.

Em todas as células aeróbicas ocorre a formação de ERO como intermediários no processo *redox* seja por interação de radiação ionizante com moléculas biológicas, co-produtos de reações de metabolismo, respiração celular, seja por atividade de enzimas específicas em células fagocíticas e não fagocíticas (Manea *et al.*, 2010). Assim sendo, as ERO são importantes constituintes da fisiologia celular, produzidos em resposta a estímulos endógenos e exógenos, sendo continuamente gerados, transformados e consumidos em diversos tecidos durante a atividade metabólica normal (Panieri, Santoro, 2015). Sua produção é relevante na fisiopatologia do etanol no sistema cardiovascular, uma vez que este composto é extensivamente metabolizado no fígado à acetaldeído principalmente pela enzima álcool desidrogenase (ADH) (Scott *et al.*, 1999). O acetaldeído, por sua vez, é oxidado a acetato pela enzima acetaldeído desidrogenase, o que resulta na geração de ERO.

O termo estresse oxidativo, originalmente conceituado como condição patológica caracterizada pelo dano molecular causado por uma desigualdade entre agentes pró-oxidantes e antioxidantes, principalmente pelo aumento de ERO (Cadenas *et al.*, 1985), atualmente possui uma definição mais elaborada e relacionada mais especificamente ao comprometimento da sinalização e equilíbrio das reações de oxidação e redução, uma vez que se sabe que as ERO modulam vias de sinalização celulares específicas (“sinalização *redox*”), levando a mudanças na transcrição de genes e síntese protéica, conseqüentemente na função celular (Montezano e Touyz,

2012; Sirker *et al.*, 2011; Viridis *et al.*, 2011). Evidências indicam que genes pró-inflamatórios são regulados por fatores de transcrição cuja expressão, estrutura e localização subcelular são direta ou indiretamente regulados pelo nível de estresse oxidativo. Da mesma forma, a função de diversas proteínas quinases/fosfatases, fosfolipases e canais iônicos também são afetados pelo equilíbrio *redox* celular (Jaulmes *et al.*, 2009; Manea, 2010). Ademais, sabe-se que as ERO, através da sinalização *redox*, induzem processos variados que inclui modulação de vias de sinalização de Ca^{2+} , com elevação transiente da concentração intracelular do íon, modulação de cascatas moleculares responsáveis pelo transporte de Ca^{2+} através de membranas, fosforilação de proteínas específicas, modulação do metabolismo de eicosanóides e estimulação do crescimento celular. Sendo assim, o estresse oxidativo não causa somente danos oxidativos diretos e irreversíveis a macromoléculas, mas também prejudica o processo de sinalização *redox* – dependente na vasculatura (Berridge *et al.*, 2003; Drummond *et al.*, 2011).

Dentre as principais ERO produzidas em células endoteliais e do músculo liso vascular, o ânion superóxido (O_2^-) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) são particularmente importantes, pois ativam diferentes vias intracelulares de sinalização, levando a respostas celulares divergentes e potencialmente opostas (Paravicini e Touyz, 2008). O papel de cada ERO na modulação de funções celulares no sistema vascular é dependente de suas características físico-químicas, determinante de sua reação com o respectivo substrato (alvo), localização subcelular e sua taxa de geração. Assim sendo, as ERO ocupam papel relevante na fisiopatologia de diferentes doenças cardiovasculares e desempenham função importante nas alterações cardiovasculares induzidas pelo etanol.

Evidências sugerem a existência de um intrincado balanço entre sistemas de produção e eliminação de ERO, altamente regulados e em constante equilíbrio com elementos celulares *redox* sensíveis a fim de rijamente modular eventos sinalizadores celulares específicos (Panieri, Santoro, 2015). No tecido vascular, dentre os sistemas antioxidantes enzimáticos principais destacam-se as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx),

tioredoxinas e peroxiredoxinas. Já os antioxidantes não enzimáticos incluem o ascorbato, tocoferóis, glutatona, bilirrubina e ácido úrico (Gongora *et al.*, 2005; Tajima *et al.*, 2009).

Já em relação à geração de ERO, diversos sistemas enzimáticos, em constante interação, são capazes de transferir elétrons do oxigênio molecular para a produção de O_2^- . Dentre eles é possível citar, como exemplo, as xantinas oxidases (XO), lipoxigenases, ciclooxygenases (COX), algumas enzimas presentes na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, óxido nítrico sintases (NOS) desacopladas, citocromo P450 redutases (Semilidis *et al.*, 2008). No entanto, as ERO formadas por estas fontes são co-produtos derivados de reações que não representam a principal função da enzima. Já o complexo enzimático formado pela NADPH oxidase tem como única e principal função a produção de ERO, cabendo a esta enzima o papel de principal produtora de ERO nas células endoteliais e do músculo liso vascular (Touyz, Briones, 2010). Essa enzima, formada por diferentes subunidades, catalisa a produção de O_2^- pela redução de O_2 usando NADPH como doador de elétron: $2O_2 + NADPH \rightarrow 2O_2^- + NADP^+ + H^+$ (**Figura 1**) (Paravicini, Touyz, 2008). A enzima NADPH oxidase protótipo é encontrada em neutrófilos sendo formada por 5 subunidades: p47phox (“*phox*” ou “*phagocyte oxidase*” – oxidase fagocítica), p67phox, p40phox, p22phox e a subunidade catalítica gp91phox (também chamada de Nox2). As subunidades p47phox, p67phox e p40phox estão localizadas no citoplasma enquanto as subunidades gp91phox e p22phox estão localizadas na membrana, onde permanecem na forma de uma flavoproteína heterodimérica, o citocromo *b558*. Em situações de estimulação celular, a subunidade p47phox é fosforilada e as unidades citoplasmáticas formam um complexo que se transloca até a membrana, onde se associam ao citocromo *b558* para formar a enzima ativa que tem por função transferir elétrons do substrato para o O_2 , formando assim o O_2^- (Paravicini e Touyz, 2008).

Embora as NADPH oxidases tenham sido descritas originalmente como enzimas expressas em células fagocíticas envolvidas na defesa do hospedeiro e imunidade inata, a descoberta de homólogos da gp91phox indicou a existência de uma família de NADPH oxidases,

e desde então um enorme progresso tem sido feito em busca do entendimento do papel destas proteínas no sistema cardiovascular. Os novos homólogos, juntamente com a gp91phox, são designados como a família Nox das NADPH oxidases e compreendem sete membros, caracterizados pela subunidade catalítica que utilizam. Compreendem a Nox1, Nox2 (gp91phox), Nox3, Nox4 (originalmente chamada *Renox* – *renal oxidase* – oxidase renal), Nox5 e Duox1 e Duox2 (Touyz e Briones, 2010). São expressas em diferentes tecidos onde desempenham ações biológicas diversificadas, e destas, a Nox1, Nox2, Nox4 e Nox5 são expressas no tecido cardiovascular, onde não participam apenas das funções cardíacas e vasculares normais, mas também contribuem para o desenvolvimento de doenças (**Figura 1**).

Figura 1. Esquema dos efeitos intracelulares induzidos pela ativação da NADPH no sistema cardiovascular. SOD: superóxido dismutase; O_2^- : ânion superóxido; H_2O_2 : peróxido de hidrogênio; $\text{OH}^\cdot$: radical hidroxila; ERO: espécies reativas de oxigênio; NO: óxido nítrico; ONOO^- : peroxinitrito; MAPK: proteínas quinase ativadas por mitógenos. Esquema adaptado de Paravicini e Touyz, 2008.

Sun e Mayan (2001) observaram que o etanol induz estresse oxidativo e reduz o relaxamento de artérias cerebrais mediado pelo NO, sendo esse efeito revertido por antioxidantes. Da mesma forma, Husain e colaboradores (2005) sugeriram que o consumo crônico de etanol induz hipertensão por um mecanismo de disfunção endotelial causada pelas ERO com conseqüente redução da produção de NO. Mais recentemente, esses pesquisadores demonstraram que o consumo de etanol induz aumento da atividade da enzima NADPH oxidase, aumento da resposta contrátil à fenilefrina e redução da resposta de relaxamento à acetilcolina em aorta de ratos (Husain *et al.*, 2007). Esse conjunto de dados sugere que o passo inicial para a disfunção cardiovascular associada ao consumo crônico de etanol envolve a formação de ERO, sendo esse processo mediado pela enzima NADPH oxidase.

Wang *et al.* (2001) demonstraram o importante papel da NADPH na geração de O_2^- , na regulação basal da pressão arterial, hipertrofia vascular e no estresse oxidativo em resposta a angiotensina II. A relação causal entre produção de ERO e a hipertensão provavelmente ocorre em nível vascular, pelo menos em parte, onde o estresse oxidativo promove disfunção endotelial, inflamação vascular, aumento da reatividade e remodelamento estrutural, levando ao aumento da resistência periférica e, por conseguinte ao aumento da pressão arterial (Touyz e Briones, 2010; Park *et al.*, 2011).

O mecanismo de ativação da NADPH oxidase é complexo e ainda não totalmente elucidado, sendo de crucial importância a ocorrência dos seguintes mecanismos: 1) Fosforilação da subunidade p47phox em múltiplos sítios de serina (Ser303-Ser379); 2) Ativação via Rac1/2, processos estes que culminam na migração das subunidades citoplasmáticas até a membrana, onde se associam ao citocromo *b558* para formar a enzima ativa (Paravicini e Touyz, 2008). A subunidade p47phox possui diversos sítios de fosforilação para a proteína quinase C (PKC), podendo ser diretamente fosforilada, o que induz alteração conformacional, resultando no aparecimento de um sítio de ligação pelo qual ocorre a interação com o citocromo (Belambri *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2012). Touyz *et al.* (2003) demonstraram em células musculares lisas de

humanos que a estimulação da NADPH oxidase pela angiotensina II é mediada via c-Src, uma quinase pertencente à família das Src quinases, altamente expressa em células musculares lisas, onde possui importante papel em eventos sinalizadores associados à contração, crescimento e migração celular. Da mesma forma, em células musculares lisas de aorta, Seshiah *et al.* (2002) demonstraram que a estimulação da NADPH oxidase pela angiotensina II é bifásica, sendo que durante a fase rápida de produção de ERO ocorre a ativação da PKC, enquanto que na fase subsequente (fase sustentada) há o envolvimento das vias de sinalização da PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase), Fator de Crescimento Epidermal (EGF), Rac e Src. Em células endoteliais vasculares tem sido demonstrado o importante papel do Fator de Necrose Tumoral (TNF- α) na ativação da enzima via PKC (Chowdhury *et al.*, 2005). Callera *et al.* (2005) demonstraram que a aldosterona também leva à ativação da enzima via c-Src, em células musculares lisas, o que demonstra participação da proteína na ativação da NADPH oxidase. Já a Rac uma vez ativada, interage com a p67phox, fornecendo uma plataforma estável adicional à associação entre p67phox e gp91phox.

A importância fisiopatológica das NADPH oxidases levou muitos pesquisadores, em um extenso número de experimentos tanto *in vivo* quanto *in vitro*, ao uso de inibidores desta enzima, sendo a apocinina considerada a principal por exibir poderosos efeitos anti-inflamatórios e anti-oxidantes em uma variedade de células e modelos animais (Elmarakby *et al.*, 2005; Hougee *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008). Em células endoteliais e do músculo liso vascular, a apocinina bloqueia a atividade da NADPH oxidase, reduzindo a geração de O₂⁻ (Muijsers *et al.*, 2000; Johnson *et al.*, 2002; Hayashi *et al.*, 2005), como também revertendo a disfunção endotelial (Unger *et al.*, 2009). Sabe-se que seu efeito decorre do bloqueio da migração da subunidade p47phox e p67phox para a membrana, desta forma, impedindo a ativação da enzima (Stolk *et al.*, 1994).

A busca pelo entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos no efeito cardiovascular do etanol levou ao estudo da ativação das Proteínas Quinase Ativadas por Mitógenos (MAPK – *Mitogen-Activated Protein Kinases*) (Yang *et al.*, 2001a,b), uma vez que

essas proteínas desempenham importante função na sinalização intracelular. As MAPK são ativadas por diferentes estímulos como fatores de crescimento, hormônios, neurotransmissores, agonistas de receptores acoplados a proteína G e ERO (Eguchi *et al.*, 1998; Callera *et al.*, 2005). As MAPK fazem parte da cascata de sinalização intracelular que controla processos como diferenciação e proliferação celular, expressão de proteínas envolvidas na adesão de leucócitos e contração vascular (Touyz e Schiffrin, 2000). Pelo menos três cascatas de MAPK distintas e paralelas foram identificadas incluindo MAPKp42/44, que também são chamadas de quinases reguladas por sinal extracelular (ERK1/2 – *extracellular signal-regulated kinases 1 and 2*), MAPKp38 e quinase c-jun N-terminal ou quinase ativada por estresse (JNK/SAPK - *c-jun N-terminal kinase or stress activated protein kinase*). Sachinidis e colaboradores (1999) mostraram que o etanol na concentração de 17 mmol/l induz fosforilação da ERK1/2 em células do músculo liso vascular *in vitro*. Posteriormente, demonstrou-se que aumento na concentração de Ca^{2+} intracelular bem como a contração induzida pelo etanol em artéria basilar de cães foi inibida por inibidores específicos da MAPKp38 e da ERK1/2 (Yang *et al.*, 2001a,b). O SB-203580, um inibidor da MAPKp38 reduziu a contração e o aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} induzida pelo etanol em aorta de ratos (Yang *et al.*, 2002). Essas observações levantam a hipótese de que a ativação das MAPK pelo etanol poderia ocorrer indiretamente via ERO.

Desta forma, o conjunto de dados apresentados demonstra que a NADPH oxidase é a principal fonte de produção de ERO na vasculatura sob condições basais e que o etanol é um importante fator indutor da geração de ERO no sistema cardiovascular. Portanto, a hipótese do presente estudo é a de que o consumo crônico de etanol induz a produção de ERO no sistema cardiovascular via NADPH oxidase. Esse processo levaria a alterações da reatividade vascular, redução da biodisponibilidade do NO, ativação das MAPK e ao aumento da pressão arterial.

Objetivo

2 OBJETIVO

O objetivo do presente estudo é avaliar a participação da NADPH oxidase no estresse oxidativo, alteração da reatividade vascular e aumento da pressão arterial induzidos pelo consumo crônico de etanol.

Materiais e Métodos

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar adultos, com idade média entre 60 e 70 dias (230-270 g), provenientes do Biotério Central do *Campus* de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Os protocolos experimentais descritos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do *Campus* de Ribeirão Preto da USP (11.1.1648.53.8).

3.2 Grupos experimentais

Os animais foram aleatoriamente distribuídos nos seguintes grupos: **1)** Grupo controle: água *ad libitum* e injeção intraperitoneal (i.p.) de salina 0,9%; **2)** Grupo controle + apocinina: água *ad libitum* e apocinina (10 mg/kg/dia; i.p.); **3)** Grupo etanol: solução de etanol a 20% em água e injeção intraperitoneal (i.p.) de salina 0,9%; **4)** Grupo etanol + apocinina: solução de etanol a 20% em água e apocinina (10 mg/kg/dia; i.p.) (Muijsers *et al.*, 2001; Hwang *et al.*, 2011; Fan *et al.*, 2012). Os animais dos grupos etanol ficaram condicionados a um breve período de adaptação gradativa do consumo de etanol, para adaptação dos mesmos ao modelo experimental. Essa adaptação consistiu no fornecimento de etanol em concentrações crescentes semanais de 5, 10 e 20%, tendo início à fase experimental após a terceira semana de tratamento (Esquema 1). O consumo de ração e de líquido foi avaliado semanalmente. Ao término da 2ª semana do início do tratamento, os animais foram mortos para realização dos experimentos funcionais e bioquímicos.

Esquema 1. Modelo de tratamento com etanol utilizado nos grupos experimentais.

3.3 Medida dos níveis sanguíneos de etanol

Os animais foram anestesiados com uretana (1,25 g/Kg, i.p., Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e o sangue (1 ml) foi coletado da veia cava inferior usando seringas heparinizadas. As amostras (100 µl) foram então transferidas para tubos *headspace* de 20 ml, contendo 500 µl de solução aquosa de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 10%. 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 min 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 × 0,25 mm I.D., espessura 0,25 µm) (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 min) a 220 °C (2 min) (15 °C/min). A temperatura do injetor e detector foram ajustadas para 220 e 300 °C, respectivamente. Os resultados foram expressos em mg de etanol/dl de sangue.

Objetivo: Avaliar as concentrações plasmáticas de etanol obtidas com o tratamento crônico.

3.4 Medida da pressão arterial

A pressão arterial foi avaliada semanalmente pelo método não invasivo da pletismografia de cauda utilizando o pletismógrafo EFF306 (Insight, Brasil). Para a análise, os animais foram ambientados nos três dias antecedentes à primeira medida. Anteriormente a cada medida, os animais ficaram expostos à câmara aquecida por 10 minutos. Os resultados obtidos se referem à média de três avaliações consecutivas.

Objetivo: Avaliar se o consumo crônico de etanol induz aumento da pressão arterial e se o tratamento com apocinina previne o aumento da pressão ao longo do tempo.

3.5 Detecção de O_2^- pelo método de quimioluminescência da lucigenina em aorta

A aorta torácica foi homogeneizada em tampão fosfato pH 7,4 (20 mmol/l de KH_2PO_4 , 1 mmol/l de EGTA e 150 mmol/l de sacarose). 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, tampão fosfato mais lucigenina) pelo valor obtido após adição de NADPH. Foram realizados 30 ciclos de leitura, utilizando-se o luminômetro Orion II-Microplate Luminometer MPL4 (Berthold). O conteúdo protéico das amostras foi analisado pelo método de Lowry (Bio-Rad, EUA) e os resultados normalizados pela concentração protéica de cada amostra, expressos como URL (unidades relativa de luz)/mg de proteína.

Objetivo: Verificar se o tratamento com etanol altera a produção do O_2^- pela enzima NADPH oxidase em tecido aórtico e se o tratamento com apocinina previne a resposta gerada.

3.6 Avaliação dos níveis teciduais de H_2O_2 em aorta

O H_2O_2 foi avaliado em aorta torácica utilizando o kit *Amplex Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay* (Invitrogen, Carlsbad, CA, código A22188). Os anéis de aorta dos

animais de cada grupo experimental foram homogeneizados em solução de Krebs (mmol/l): NaCl 130; KCl 4,7; KH_2PO_4 1,18; MgSO_4 1,17; NaHCO_3 14,9; Glicose 5,5; CaCl_2 1,6; pH 7,4), sendo o homogenato obtido centrifugado a 10.000 rpm, 4 °C por 5 minutos. Para a montagem da placa, à cada 50 μl do sobrenadante obtido foi adicionado 50 μl de *working solution* formada basicamente pelo reagente *Amplex Red* (10-acetil-3,7-diidroxifenoxazine) e a HRP. O reagente *Amplex Red* na presença da peroxidase reage com o H_2O_2 presente em cada amostra, produzindo a resorufina, produto altamente fluorescente ($\lambda_{\text{excitação}}$ 571, $\lambda_{\text{emissão}}$ 585 nm). Uma curva padrão de H_2O_2 foi construída e os valores de concentração obtidos foram expressos em $\mu\text{mol/l/mg}$ proteína.

Objetivo: Verificar se o tratamento com etanol altera a produção de H_2O_2 em tecido aórtico e a participação da NADPH oxidase nesta resposta.

3.7 Vizualização de espécies reativas de oxigênio *in situ*

Segmentos de aorta foram congelados em OCT (Sakura Finetek, Torrance, CA, EUA), utilizando-se acetona e gelo seco. Os tecidos foram cortados em criostato, a 4 μm de espessura. As concentrações vasculares de O_2^- e H_2O_2 foram detectadas *in situ* (tecido aórtico) utilizando as sondas fluorescentes de dihidroetídeo (DHE - 10 $\mu\text{mol/l}$) (Ceron, Rizzi *et al.*, 2013) e diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA – 5 $\mu\text{mol/l}$), respectivamente (Bubolz *et al.*, 2012). Após a incubação por 30 minutos a 37°C em câmara úmida e escura, os cortes foram lavados com tampão salina fosfato (PBS). Com auxílio de um microscópio de fluorescência (Leica Imaging Systems Ltd., Cambridge, England) acoplado a câmera fotográfica, as imagens dos cortes foram fotografadas num aumento de 400x (DHE) e 200x (DCFH-DA).

Objetivo: Vizualizar, por meio de imagens *in situ*, a formação de ERO intracelular e geração de estresse oxidativo induzido pelo consumo crônico de etanol.

3.8 Determinação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no plasma e tecido aórtico

A avaliação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico é um método bem estabelecido para o rastreamento e monitoramento da peroxidação lipídica, indicador de estresse oxidativo em células, tecidos e fluidos (Yagi, 1998). O ensaio (*TBARS assay kit*, Cayman Chemical Company, EUA, Cat. nº 10009055) consistiu na medida colorimétrica (comprimento de onda de 530-540 nm) do complexo formado pela reação do MDA (malondialdeído – ácido graxo poliinsaturado, produto de peroxidação lipídica) e TBA (ácido tiobarbitúrico) sob alta temperatura (90-100 °C) em meio ácido. Valores maiores de TBARS, expressos em nmol/ml, são alcançados proporcionalmente à presença de maior quantidade de lipídios poliinsaturados. Para realização do ensaio em tecido aórtico foram utilizados 25 mg de tecido de cada amostra.

Objetivo: Verificar se o tratamento crônico com etanol gera aumento da peroxidação lipídica, indicando aumento do estresse oxidativo, e se o tratamento com apocinina previne este efeito.

3.9 Avaliação do consumo de etanol sobre os níveis de nitrato e nitrito (NOx) plasmático e tecidual

Anéis de aorta torácica foram homogeneizados em PBS pH 7,4 e o homogenato centrifugado a 10.000g, 4 °C, durante 20 minutos. Logo após, 500 µL tanto do sobrenadante obtido de tecido aórtico, quanto de plasma foram ultrafiltrados (Amicon Ultra-0.5 ml 30Kda, Millipore), em temperatura ambiente, a 14.000 x g por 10 minutos, afim de reduzir leitura de absorbância decorrente da presença de hemoglobina nas amostras, conforme especificações indicadas pelo fabricante (*Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit*, Cayman Chemical Company, código 780001). A medida da absorbância (540-550nm) determinou as concentrações de nitrato e nitrito de cada amostra estudada.

Objetivo: Verificar se o consumo de etanol induz alteração nos níveis de NO tecidual e plasmático e avaliar a participação da NADPH oxidase nessa resposta.

3.10 Determinação da atividade enzimática da Xantina Oxidase (XO) em tecido aórtico

Anéis de aorta foram homogeneizados em tampão Tris-HCl (100 mmol/l), pH 7,5, sendo o homogenato final centrifugado a 10.000g por 15 minutos a 4 °C. A partir deste processo, 50 µL do sobrenadante de cada amostra foram obtidos para a realização do teste. O ensaio (*Xanthine Oxidase Fluorimetric Assay Kit*, Cayman Chemical Company, EUA, Cat. nº 10010895) baseia-se em reações enzimáticas, nas quais a xantina oxidase primeiramente produz H₂O₂ durante a oxidação da hipoxantina. Na presença da peroxidase *horseradish* (HRP), o H₂O₂ reage com o ADHP (10-acetil-3,7-dihidroxi fenoxazina), produzindo o composto fluorescente resorufina que foi avaliada fluorimetricamente (λexcitação 520-550, λemissão 585-595 nm). Os valores foram expressos em µU/ml/mg proteína.

Objetivo: Verificar se o tratamento realizado nos grupos experimentais altera a atividade enzimática da XO.

3.11 Determinação da atividade enzimática da SOD no plasma e tecido aórtico

Anéis de aorta foram homogeneizados em tampão HEPES (20 mmol/l), pH 7,2 contendo 1mmol/l de EGTA, 210 mmol/l de manitol e 70 mmol/l de sacarose, sendo o homogenato final centrifugado a 1.500g por 5 minutos a 4 °C, afim de obter 10 µL de sobrenadante para a realização do teste. O mesmo volume de amostras de plasma foi utilizado. O ensaio (*Superoxide Dismutase Assay Kit*, Cayman Chemical Company, EUA, Cat. nº 706002) utiliza o sal de tetrazólio para a detecção de radicais superóxido gerados pela xantina oxidase e hipoxantina, sendo que a reação gera o produto cromogênico, corante de formazan, com absorbância monitorada a 440-460nm. Uma unidade de SOD (U/ml) é definida como a quantidade de enzima necessária para que ocorra 50% da dismutação do radical superóxido.

Objetivo: Verificar se o tratamento realizado nos grupos experimentais altera a atividade enzimática da SOD.

3.12 Determinação da atividade enzimática da catalase (CAT) no plasma e tecido aórtico

Anéis de aorta foram homogeneizados em tampão contendo KH_2PO_4 (50 mmol/l) e EDTA (1 mmol/l), pH 7,0 e logo em seguida centrifugados a 10.000g por 15 minutos a 4 °C, sendo que 20 µl do sobrenadante e também de plasma foram utilizados para o teste. O ensaio (*Catalase Assay Kit, Cayman Chemical Company*, EUA, Cat. nº 707002) avalia a função peroxidativa da enzima e é baseado na reação da CAT com o metanol em uma concentração ótima de H_2O_2 . O formaldeído produzido é mensurado colorimetricamente (540 nm) a partir de sua reação com o 4-amino-3-hydrazino-5-mercaptop-1,2,4-triazole (*Purpald*) o que gera coloração púrpura. A atividade da enzima é calculada a partir das concentrações de formaldeído obtidas por regressão linear e uma unidade de CAT é definida como a quantidade de enzima que causará a formação de 1 nmol de formaldeído por minuto a 25 °C e expressa como nmol/min/ml.

Objetivo: Verificar se o tratamento realizado nos grupos experimentais altera a atividade enzimática da catalase.

3.13 Determinação da atividade enzimática da Glutathione Peroxidase (GPx) no tecido aórtico

Anéis de aorta foram homogeneizados em tampão Tris-HCl (50mmol/l), pH 7,5 contendo 5 mmol/l de EDTA, 1 mmol/l de DTT, sendo o homogenato final centrifugado a 10.000g por 15 minutos a 4 °C, afim de obter 20 µl de sobrenadante para a realização do teste. O ensaio (*Glutathione Peroxidase Assay Kit, Cayman Chemical Company*, EUA, Cat. nº 703102) avalia a atividade da GPx indiretamente pela reação acoplada com a Glutathione Redutase (GR), o que gera NADP^+ . Este processo é acompanhado pelo decréscimo da absorbância avaliada a 340nm. A taxa de diminuição da absorbância é diretamente proporcional a atividade da GPx de cada amostra e o resultado é expresso em nmol/min/mg proteína.

Objetivo: Verificar se o tratamento realizado nos grupos experimentais altera a atividade enzimática da GPx.

3.14 Determinação dos níveis de GSH (glutathiona reduzida) no plasma e tecido aórtico

A aorta torácica foi homogeneizada em PBS pH 7,4 e 100 µL do homogenato ou plasma foram adicionados a 100 µL de ácido tricloroacético (TCA, 12,5%), permanecendo no gelo por 30 minutos e centrifugado a 3.000 rpm por 15 minutos a 4 °C. A montagem da placa foi realizada pela adição de 30 µL da amostra, 270 µL de Tris HCl. A cada poço foi incorporado 5 µL de Ácido 5,5-ditiobis (2-nitrobenzóico) (DTNB; 3,96 mg DTNB em 1 ml de metanol), reagente que quando em contato com o grupo SH – tiol dos grupos sulfidrílicos, produz coloração amarela, lida espectrofotometricamente a 415 nm. Os valores individuais foram interpolados em uma curva padrão de GSH e expressos em µg GSH/g tecido.

Objetivo: Verificar se o tratamento realizado nos grupos experimentais altera os níveis de glutathiona reduzida.

3.15 Determinação da capacidade antioxidante total no plasma

Amostras de sangue dos animais de cada grupo experimental foram coletadas com heparina e o plasma obtido por centrifugação (10.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C). O plasma foi diluído (1:20) para realização do ensaio (*Antioxidant assay kit*, Cayman Chemical Company, EUA, Cat. nº709001). O ensaio consiste na habilidade dos antioxidantes de cada amostra em inibir a oxidação do ABTS pela metamioglobina, capacidade comparada a do Trolox (análogo tocoferol solúvel em água). A quantidade de ABTS oxidado produzido foi monitorada pela leitura da absorbância a 750 nm, sendo que os antioxidantes causaram supressão da absorbância em um grau comparável à sua concentração. Os resultados foram expressos como mmol/l de atividade antioxidante.

Objetivo: Verificar se o tratamento realizado nos grupos experimentais altera o sistema antioxidante total.

3.16 Western Immunoblotting

Trinta µg de proteína total de amostras de aorta foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (10%) por 1 hora e 20 minutos a 150V em aparelho para mini-gel (mini Protean III, Bio-Rad, CA, EUA). A seguir as proteínas foram eletricamente transferidas para membrana de nitrocelulose (bio-Rad, CA, EUA) a 100 V por 1 hora e 30 minutos. A eficácia da transferência foi verificada pela coloração vermelho de Ponceau. As membranas foram incubadas em tampão tris salina (TBS-T) contendo Tris (10 mmol/l), NaCl (150 mmol/l), Tween 20 (0,02%) e leite desnatado (7%) por 1 hora para reduzir a ligação inespecífica dos anticorpos às proteínas na membrana. Após o bloqueio as membranas foram incubadas com anticorpo primário por 12 horas a 4°C. Os anticorpos que foram utilizados para a realização do experimento estão especificados na Tabela 1. As membranas foram incubadas com anticorpo secundário ligado a peroxidase por 1,5 horas. Os sinais foram revelados pela exposição das membranas a solução de quimioluminescência (ECL) e captados pelo sistema de fotodocumentação da BIORAD (ChemiDocTM XRS+). Depois de reveladas, as bandas foram submetidas à análise de densitometria óptica. Os resultados foram normalizados pela expressão da β-actina.

Objetivo: *Verificar se o tratamento crônico com etanol é capaz de alterar a expressão de subunidades da NADPH oxidase e de proteínas alvo envolvidas em sua ativação e regulação.*

Tabela 1. Anticorpos primários e secundários, com suas respectivas diluições, utilizados para realização de Western Immunoblotting.

<i>Anticorpo</i>	<i>Código</i>	<i>Diluição</i>	<i>Anticorpo Secundário</i>
-Mox1(H-15)	Santa Cruz Biotechnology sc-5821	1:500	Goat* 1:1000
-gp 91 phox (c-15)	Santa Cruz Biotechnology sc-5827	1:375	Goat 1:5000
-Nox4 (H-300)	Santa Cruz Biotechnology sc-30141	1:500	Rabbit 1:3000
-p47phox (H-195)	Santa Cruz Biotechnology sc-14015	1:500	Rabbit** 1:1000
-anti-Noxol1	Santa Cruz Biotechnology sc-292094	1:500	Rabbit 1:1000
-anti-p38MAPK total	Cell Signaling 9212S	1:1000	Rabbit 1:1000
-anti-Fosfo-p38MAPK (Thr¹⁸⁰/Tyr¹⁸²)	Cell Signaling 9211S	1:1000	Rabbit 1:1000
-anti-SAPK/JNK total	Cell Signaling 9252S	1:1000	Rabbit 1:1000
-anti-Fosfo SAPK/JNK (Thr¹⁸³/Tyr¹⁸⁵)	Cell Signaling 4668S	1:1000	Rabbit 1:1000
-anti-ERK1/2 total	Cell Signaling 9102	1:1000	Rabbit 1:1000
-anti-Fosfo-ERK1/2 (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴)	Cell Signaling 9101S	1:1000	Rabbit 1:1000
-anti-nNOS	Cell Signaling 4234S	1:500	Rabbit 1:5000
-anti-iNOS	Santa Cruz Biotechnology sc-650	1:500	Rabbit 1:5000
-anti-eNOS	Sigma-Aldrich N3893	1:500	Rabbit 1:5000
-Anti-Akt total	Cell Signaling 9272	1:1000	Rabbit 1:1000
-anti-Fosfo-Akt (Ser⁴⁷³)	Cell Signaling 4058S	1:1000	Rabbit 1:1000
-anti-PKC δ (C-20)	Santa Cruz Biotechnology sc-937	1:500	Rabbit 1:1000
- anti-c-Src	Santa Cruz Biotechnology sc-8056	1:500	Mouse 1:1000
-Anti - Rac1	Santa Cruz Biotechnology sc-217	1:250	Rabbit 1:1000
- anti-Fosfo-PKC δ [Tyr³¹¹]	Cell Signaling 2055S	1:500	Rabbit 1:1000
- anti-Fosfo c-Src [Tyr⁴¹⁸]	MyBioSource MBS857078	1:500	Mouse 1:1000
- anti-Fosfo-Rac1 [Ser⁷¹]	Santa Cruz Biotechnology sc-135641	1:500	Rabbit 1:1000
-anti-SOD1	Santa Cruz Biotechnology sc-8637	1:500	Goat 1:1000
-anti-SOD2	Santa Cruz Biotechnology sc-30080	1:500	Rabbit 1:1000
-anti-SOD3	Santa Cruz Biotechnology sc-32220	1:500	Goat 1:1000
-β-actina	Santa Cruz Biotechnology sc-47778	1:5000	Mouse*** 1:5000

* Jackson ImmunoResearch cod.305-035-003; **Jackson ImmunoResearch cod.111-035-003;

*** Jackson ImmunoResearch cod.115-035-003

-Para a realização dos experimentos, todos os géis foram feitos na porcentagem de 10% de poliácridamida.

3.17 Fracionamento citosol/membrana

Aortas torácicas foram homogeneizadas em tampão de lise contendo 50 mmol/l Tris-HCl (pH 7.4), 2.5 mM EDTA, 5 mM EGTA e inibidor de protease. Os homogenatos foram centrifugados a 100.000 g por 1 h, 4 °C. O sobrenadante, (fração citosólica) foi coletado. O *pellet*, contendo a fração particulada, foi ressuspenso em tampão de lise contendo 1% Triton X-100 e centrifugado a 10.000 g por 10 min, 4 °C e o sobrenadante coletado (fração de membrana) (Callera *et al.*, 2006; Yogi *et al.*, 2012).

Objetivo: Verificar se o tratamento com etanol promove alteração da translocação da subunidade citosólica p47^{phox} e Nox1.

3.18 Estudo funcional da reatividade vascular em aorta

Os animais foram anestesiados com uretana (1,25 g/Kg em solução de 25%, i.p.), posteriormente sacrificados por exsanguinação seguida de rompimento do diafragma e a artéria aorta torácica removida. Dois ganchos de metal foram inseridos no lúmen para produzir tensão de 15 mN. As modificações de tônus vascular foram registradas através de sistema de aquisição de sinais TRI201 (Panlab, Espanha) e processadas pelo software ChartPro 5 (ADInstruments, Austrália). O sistema foi montado em câmara para órgão isolado contendo solução de Krebs cuja composição é (em mmol/l): NaCl 130; KCl 4,7; KH₂PO₄ 1,18; MgSO₄ 1,17; NaHCO₃ 14,9; Glicose 5,5; CaCl₂ 1,6; pH 7,4 (Russel eWatts, 2000). 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 permaneceram em repouso durante 60 minutos para estabilização. Em seguida, as artérias foram estimuladas com fenilefrina (0,1 µmol/l) até a reprodução da amplitude da resposta contrátil. 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 (1µmol/l) sobre contração mantida estimulada com fenilefrina.

A reatividade vascular foi estudada a partir da obtenção de curvas concentração-resposta por regressão não-linear (GraphPad Prism 3.0) para fenilefrina (10 nmol/l a 10 μ mol/l), cloreto de potássio (KCl) (10 a 120 mmol/l) em aorta com ou sem endotélio. As curvas de relaxamento para acetilcolina (0,1 nmol/l a 10 μ mol/l) e nitroprussiato de sódio (0,1 nmol/l a 0,3 μ mol/l) foram obtidas em anéis com e sem endotélio, respectivamente. A partir das curvas concentração-resposta, foram determinados os valores de pD_2 que consiste no logaritmo negativo da concentração molar do agente vasoativo que promove 50% do efeito máximo (EC_{50}), bem como os respectivos efeitos máximos (E_{max}).

Objetivo: *Verificar se o tratamento promovido nos grupos experimentais promove alteração da reatividade vascular.*

3.19 Análise estatística

Análise de variância de uma via (ANOVA), seguida pelo pós-teste de Newman-Keuls e o teste “t” de Student foram realizados para detectar as diferenças entre os valores em estudo. $P < 0,05$ foi considerado significativo.

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre o peso corporal dos animais, consumo de ração e ingestão líquida

O peso corporal dos animais dos quatro grupos experimentais tratados foi avaliado diariamente e o respectivo ganho representado a cada semana de tratamento (Figura 2). Os animais que fazem parte dos grupos tratados com etanol (etanol e etanol + apocinina), já na primeira semana de adaptação (etanol a 5%) apresentaram um menor ganho de peso comparado aos animais não tratados com etanol. Na segunda semana de adaptação, os animais do grupo etanol + apocinina apresentaram um maior ganho de peso comparado ao grupo etanol. O mesmo ocorreu durante a terceira semana de adaptação. Já na primeira e segunda semanas de tratamento, os animais do grupo tratado cronicamente com injeções i.p. de apocinina (controle + apocinina) apresentaram um maior ganho de peso quando comparado aos demais grupos.

Figura 2. Média do peso dos animais durante o período de tratamento. O peso (gramas) de 18 animais de cada grupo foi medido diariamente e representado a cada semana. Os pontos representam a média $\pm$ EPM. *diferença dos grupos etanol e etanol + apocinina em relação aos grupos controle e controle + apocinina; #diferença do grupo etanol em relação ao grupo controle, controle + apocinina e etanol + apocinina; f diferença do grupo controle + apocinina em relação ao grupo controle, etanol e etanol + apocinina ($p < 0,05$; ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls).

O consumo de ração pelos animais de cada grupo foi avaliado semanalmente e uma estimativa do consumo individual foi realizada pela divisão do consumo total pelo número de animais presentes em cada caixa. Na primeira semana de adaptação o consumo de ração do grupo etanol foi menor em relação ao grupo controle. Nas seguintes segunda e terceira semanas de adaptação os dois grupos tratados com etanol (etanol e etanol+ apocinina) apresentaram um menor consumo de ração quando comparado aos não tratados. Vale ressaltar que na terceira semana, na qual os animais recebem etanol a 20%, o consumo de ração diminuiu acentuadamente nestes grupos. Na primeira semana de tratamento, os animais do grupo controle + apocinina apresentaram um maior consumo de ração em relação aos demais grupos. Na segunda semana de tratamento, os animais do grupo etanol + apocinina apresentam um maior consumo de ração quando comparados ao grupo etanol.

Figura 3. Consumo de ração entre os animais durante o período de tratamento. O consumo foi avaliado semanalmente. Os pontos representam a média $\pm$ EPM. * diferença do grupo etanol em relação ao controle; # diferença do grupo etanol e etanol + apocinina em relação ao grupo controle e controle + apocinina; + diferença do grupo controle + apocinina em relação ao controle; f diferença do grupo etanol + apocinina em relação ao grupo etanol ($p < 0,05$; ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls).

O consumo líquido foi avaliado semanalmente por uma estimativa realizada pela divisão do consumo total pelo número de animais presentes em cada caixa. Na primeira semana de adaptação, os grupos tratados não apresentaram diferença em relação ao consumo líquido. Já na segunda semana de adaptação, foi possível observar que os animais do grupo controle + apocinina, apresentaram maior ingestão de líquido quando comparado ao grupo controle. Na terceira semana, os animais do grupo etanol apresentaram uma diminuição da ingestão líquida quando comparados aos grupos tratados com água (controle e controle + apocinina) e também em relação ao grupo etanol + apocinina. Este fato é revertido uma semana após, sendo que os animais que recebem etanol não apresentam diferença na ingestão, permanecendo a diferença destes para os grupos que ingerem água até o fim do tratamento.

Figura 4. Ingestão líquida entre os animais durante o período de tratamento. O consumo foi avaliado semanalmente. Os pontos representam a média $\pm$ EPM. *Diferença do grupo controle + apocinina em relação ao controle; #diferença do grupo etanol em relação ao grupo etanol + apocinina; f diferença do grupo etanol e etanol + apocinina em relação ao grupo controle e controle + apocinina ($p < 0,05$; ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls).

4.2 Medida dos níveis de etanol (mg/dl) no sangue

O etanol foi detectado no sangue dos animais, sendo que os animais do grupo etanol apresentaram concentração de $146,8 \pm 26,8$ mg/dl, $n=8$ (32 mmol/l) e os animais do grupo etanol + apocinina o equivalente a $150,8 \pm 22,4$ mg/dl, $n=8$ (33 mmol/l). Não foi encontrada diferença significativa na concentração sanguínea de etanol entre os dois grupos.

4.3 Participação da NADPH oxidase nos efeitos do tratamento crônico com etanol sobre a pressão arterial

Os valores basais de pressão arterial sistólica (PAS) aumentaram após o tratamento crônico com etanol em relação ao grupo controle. Esse aumento foi prevenido pela apocinina (Figura 5).

Figura 5. Participação da NADPH oxidase nos efeitos do tratamento crônico com etanol sobre a pressão arterial sistólica (PAS). A PAS foi avaliada pelo método não invasivo da pletismografia de cauda nos animais do grupo Controle ($n=10$), Etanol ($n=13$), Controle+APO ($n=10$) e Etanol+APO ($n=14$). Os resultados são representados como a média $\pm$ EPM. *Diferença em relação ao grupo controle, controle + apocinina e etanol + apocinina ($p<0,05$; ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls).

4.4 Participação da NADPH oxidase nos efeitos do tratamento crônico com etanol sobre a reatividade de anéis de aorta torácica

4.4.1 Participação da NADPH oxidase nos efeitos do tratamento crônico com etanol sobre a reatividade de anéis de aorta à fenilefrina

Na figura 6 estão representadas curvas concentração-resposta para fenilefrina realizadas em preparações isoladas de aorta torácica, com e sem endotélio. O tratamento crônico com etanol promoveu aumento da contração induzida por fenilefrina em anéis com e sem endotélio. O tratamento com apocinina preveniu o aumento na contração tanto na presença quanto na ausência de endotélio. Na Tabela 2 estão representados os valores de E_{max} e pD_2 correspondentes às curvas concentração-resposta para fenilefrina.

Figura 6. Participação da NADPH oxidase nos efeitos do tratamento crônico com etanol na resposta contrátil induzida por fenilefrina em anéis de aorta com e sem endotélio. Realizaram-se curvas concentração-resposta para fenilefrina em anéis de aorta de ratos do grupo controle, etanol, controle + apocinina e etanol + apocinina. Os pontos representam a média + EPM da contração em resposta a uma dada concentração fenilefrina. * Diferença em relação ao grupo controle e etanol + apocinina; # diferença em relação ao grupo controle, controle + apocinina e etanol + apocinina ($P < 0,05$, ANOVA seguido do teste de Newman-Keuls).

Tabela 2. Valores de E_{max} (mN) e pD₂ calculados a partir de curvas concentração-resposta para fenilefrina em preparações isoladas de aorta torácica com e sem endotélio.

Grupos	Com Endotélio		Sem Endotélio	
	E _{max}	pD ₂	E _{max}	pD ₂
Controle	11,7 ± 0,9 (8)	7,1 ± 0,2	14,0 ± 0,3 (6)	8,1 ± 0,4
Etanol	15,5 ± 0,6* (6)	7,7 ± 0,3	17,7 ± 0,6 [#] (5)	8,0 ± 0,1
Controle + apocinina	12,7 ± 1,2 (7)	7,7 ± 0,4	11,1 ± 1,4 (6)	7,4 ± 0,0
Etanol + apocinina	11,4 ± 0,9 (7)	7,5 ± 0,3	13,6 ± 0,8 (6)	8,3 ± 0,3

- Algarismos entre parênteses indicam o número de preparações isoladas. Os valores são expressos como a média ± EPM. *Diferença em relação ao grupo controle e etanol + apocinina [#]Diferença em relação ao grupo controle, controle + apocinina e etanol + apocinina (P<0,05, ANOVA seguido do teste de Newman-Keuls).

4.4.2 Participação da NADPH oxidase nos efeitos do tratamento crônico com etanol sobre a reatividade de anéis de aorta ao KCl

Na figura 7 estão representadas curvas concentração-resposta para KCl realizadas em preparações isoladas de aorta torácica, com e sem endotélio, onde é possível observar que o tratamento realizado nos grupos experimentais não alterou a contração promovida por este agente. Na Tabela 4 estão representados os valores de E_{max} e pD_2 correspondentes às curvas concentração-resposta para KCl.

Figura 7. Participação da NADPH oxidase nos efeitos do tratamento crônico com etanol na resposta contrátil induzida por KCl em anéis de aorta com e sem endotélio. Realizaram-se curvas concentração-resposta para KCl em anéis de aorta de ratos do grupo controle, etanol, controle + apocinina e etanol + apocinina. Os pontos representam a média + EPM da contração em resposta a uma dada concentração KCl.

Tabela 3. Valores de E_{max} (mN) e pD_2 calculados a partir de curvas concentração-resposta para KCl em preparações isoladas de aorta torácica com e sem endotélio.

Grupos	Com Endotélio		Sem Endotélio	
	E_{max}	pD_2	E_{max}	pD_2
Controle	$12,7 \pm 0,6$ (7)	$1,8 \pm 0,04$	$12,2 \pm 1,7$ (8)	$1,9 \pm 0,08$
Etanol	$10,8 \pm 1,1$ (6)	$1,8 \pm 0,04$	$10,7 \pm 1,3$ (7)	$2,0 \pm 0,09$
Controle + apocinina	$13,0 \pm 1,3$ (6)	$1,8 \pm 0,06$	$10,1 \pm 1,3$ (6)	$2,0 \pm 0,09$
Etanol + apocinina	$12,9 \pm 1,0$ (6)	$1,9 \pm 0,06$	$11,2 \pm 1,4$ (7)	$2,1 \pm 0,1$

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

4.4.3 Participação da NADPH oxidase nos efeitos do tratamento crônico com etanol sobre a reatividade de anéis de aorta à acetilcolina e NPS

Na Figura 8 estão representadas as curvas concentração-resposta para acetilcolina e NPS obtidas em preparações isoladas de aorta torácica com e sem endotélio, respectivamente. O tratamento realizado nos animais não alterou o relaxamento vascular induzido por ambos. Na Tabela 4 estão representados os valores de Emax (% de relaxamento) e pD₂ correspondentes às curvas concentração-resposta para acetilcolina e NPS.

Figura 8. Participação da NADPH oxidase nos efeitos do tratamento crônico com etanol na resposta de relaxamento induzida pela acetilcolina e NPS em anéis de aorta torácica de rato. Realizaram-se curvas concentração-resposta para acetilcolina e NPS em anéis de aorta com e sem endotélio de animais do grupo controle, etanol, controle + apocinina e etanol + apocinina. Os resultados são representados como a média $\pm$ EPM.

Tabela 4. Valores de Emax (% de relaxamento) e pD₂ calculados a partir de curvas concentração-resposta para acetilcolina ou nitroprussiato de sódio em anéis de aorta torácica com endotélio ou sem endotélio, respectivamente.

Grupos	Acetilcolina		NPS	
	Emax	pD ₂	Emax	pD ₂
Controle	97,5 $\pm$ 3,7 (7)	8,2 $\pm$ 0,1	110,1 $\pm$ 2,8 (5)	8,3 $\pm$ 0,2
Etanol	100,8 $\pm$ 2,5 (8)	8,0 $\pm$ 0,3	110,8 $\pm$ 1,2 (6)	8,2 $\pm$ 0,1
Controle + apocinina	100,1 $\pm$ 6,0 (7)	8,2 $\pm$ 0,2	105,2 $\pm$ 1,5 (5)	8,3 $\pm$ 0,04
Etanol + apocinina	103,1 $\pm$ 2,8 (6)	8,1 $\pm$ 0,1	110,7 $\pm$ 2,8 (5)	8,3 $\pm$ 0,1

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

4.5 Avaliação do estresse oxidativo

4.5.1 Participação da NADPH oxidase nos efeitos do tratamento crônico com etanol sobre a produção de O_2^- e H_2O_2 em aorta de ratos

O tratamento crônico com etanol aumentou os níveis de O_2^- em tecido aórtico via NADPH oxidase (Figura 9A). O tratamento dos animais com apocinina preveniu este aumento. Não foi observada diferença significativa nos níveis aórticos de H_2O_2 após tratamento crônico com etanol (Figura 9B).

Figura 9. Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a produção de O_2^- e H_2O_2 em aorta de ratos. A produção de O_2^- foi mensurada pelo método da quimioluminescência da lucigenina (A) e a produção de H_2O_2 foi mensurada por fluorimetria utilizando o reagente *Amplex Red* (B). Foram utilizadas aortas de animais do grupo controle, etanol, controle + apocinina e etanol + apocinina (n=6-9). Os resultados são representados como a média $\pm$ EPM. *Diferença em relação ao grupo controle, controle + apocinina e etanol + apocinina (p<0,05; ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls).

4.5.2 Participação da NADPH oxidase nos efeitos do tratamento crônico com etanol sobre os níveis de O_2^- e H_2O_2 em aorta de ratos

Como é possível visualizar na figura 10A, o tratamento crônico com etanol aumentou a produção *in situ* de O_2^- em tecido aórtico. O tratamento dos animais com apocinina preveniu este aumento. Já na Figura 10B é possível observar as imagens representativas da produção de H_2O_2 no tecido aórtico dos animais dos grupos experimentais. Como avaliado quantitativamente pela técnica de *amplex red*, não houve diferença nos níveis do radical livre após tratamento crônico com etanol.

Figura 10. Visualização da geração de O_2^- e H_2O_2 em cortes de tecido aórtico detectados pelas sondas fluorescentes DHE e DCFH-DA, respectivamente. A geração de O_2^- (A) e H_2O_2 (B) foram avaliadas *in situ* em aortas de animais do grupo controle, etanol, controle + apocinina e etanol + apocinina.

4.5.3 Participação da NADPH oxidase nos efeitos do tratamento crônico com etanol sobre os níveis de TBARS no plasma e aorta de ratos

Na Figura 11 estão representados os valores de TBARS encontrados em plasma e tecido aórtico dos animais dos grupos experimentais. O tratamento crônico com etanol aumentou os níveis de TBARS no plasma e em tecido aórtico quando comparado a animais do grupo controle, sendo este aumento prevenido pela apocinina.

Figura 11. Participação da NADPH oxidase nos efeitos do tratamento crônico com etanol sobre os níveis de TBARS em plasma (A) e aorta (B) de ratos. Os níveis de TBARS foram avaliados por espectrofotometria em plasma e aortas de animais do grupo controle, etanol, controle + apocinina e etanol + apocinina (n=8-12). Os resultados são representados como a média $\pm$ EPM. *Diferença em relação ao grupo controle, controle + apocinina e etanol + apocinina ($p < 0,05$; ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls).

4.5.4 Participação da NADPH oxidase nos efeitos do tratamento crônico com etanol sobre os níveis de nitrato e nitrito (NOx) plasmáticos e teciduais

O tratamento crônico com etanol diminuiu os níveis de NOx no plasma e em tecido aórtico. O tratamento dos animais com apocinina não preveniu esta resposta.

Figura 12. Participação da NADPH oxidase nos efeitos do tratamento crônico com etanol sobre os níveis nitrato e nitrito no plasma (A) e aorta (B) de ratos. Os níveis de nitrato e nitrito foram avaliados por espectrofotometria em plasma e aortas de animais do grupo controle, etanol, controle + apocinina e etanol + apocinina (n=7-8). Os resultados são representados como a média $\pm$ EPM. **Diferença em relação ao grupo controle ($p < 0,05$; ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls).

4.5.5 Participação da NADPH oxidase nos efeitos do tratamento crônico com etanol sobre a atividade da Xantina Oxidase (XO) em aorta de ratos

Na figura 13, é possível observar que, em amostras de tecido aórtico, o tratamento crônico com etanol não promoveu alteração na atividade enzimática da XO.

Figura 13. Participação da NADPH oxidase nos efeitos do tratamento crônico com etanol sobre a atividade da XO em aorta de ratos. A atividade da XO foi avaliada fluorimetricamente em aortas de animais do grupo controle, etanol, controle + apocinina e etanol + apocinina ($n=6-7$). Os resultados são representados como a média $\pm$ EPM.

4.6 Avaliação do sistema antioxidante

4.6.1 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a atividade enzimática da SOD no plasma e tecido aórtico

O tratamento com etanol diminuiu a atividade plasmática da SOD em relação ao controle (Figura 14A). O tratamento com apocinina preveniu esta resposta. Já em tecido aórtico, o tratamento com etanol não causou alteração na atividade da SOD (Figura 14B).

Figura 14. Participação da NADPH oxidase nos efeitos do tratamento crônico com etanol sobre a atividade da SOD em plasma (A) e aorta (B) de ratos. A atividade da SOD foi avaliada por espectrofotometria em plasma e aortas de animais do grupo controle, etanol, controle + apocinina e etanol + apocinina (n=8). Os resultados são representados como a média $\pm$ EPM. *Diferença em relação ao grupo controle, controle + apocinina e etanol + apocinina ($p < 0,05$; ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls).

4.6.2 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a atividade enzimática da catalase (CAT) no plasma e tecido aórtico

O tratamento com etanol não promoveu alteração na atividade enzimática plasmática e tecidual da CAT. Em aorta de animais que receberam o tratamento com apocinina, foi observado aumento da atividade da enzima em relação ao grupo controle.

Figura 15. Participação da NADPH oxidase nos efeitos do tratamento crônico com etanol sobre a atividade da CAT em plasma (A) e aorta (B) de ratos. A atividade da CAT foi avaliada por espectrofotometria em plasma e aortas de animais do grupo controle, etanol, controle + apocinina e etanol + apocinina (n=6-10). Os resultados são representados como a média $\pm$ EPM. **Diferença em relação ao grupo Controle ($p < 0,05$; ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls).

4.6.3 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a atividade enzimática da Glutathione Peroxidase (GPx) no tecido aórtico

Em tecido aórtico, o tratamento crônico com etanol não promoveu alteração da atividade da GPx, como observado na figura 16.

Figura 16. Participação da NADPH oxidase nos efeitos do tratamento crônico com etanol sobre a atividade da GPx em aorta de ratos. A atividade da GPx foi avaliada por espectrofotometria em aortas de animais do grupo controle, etanol, controle + apocinina e etanol + apocinina (n=7-10). Os resultados são representados como a média $\pm$ EPM.

4.6.4 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre os níveis de glutathiona reduzida (GSH) no plasma e tecido aórtico

Tanto no plasma, quanto em tecido aórtico, o tratamento com etanol não promoveu alteração nos níveis de GSH. No entanto, os níveis de GSH no plasma de animais tratados com apocinina apresentaram aumento em relação ao controle (Figura 17A). Em tecido aórtico, houve aumento de GSH no grupo controle + apocinina em relação ao controle (Figura 17B).

Figura 17. Participação da NADPH oxidase nos efeitos do tratamento crônico com etanol sobre os níveis de GSH em plasma (A) e aorta (B) de ratos. Os níveis de GSH foram avaliados por espectrofotometria em plasma e aortas de animais do grupo controle, etanol, controle + apocinina e etanol + apocinina (n=6-10). Os resultados são representados como a média $\pm$ EPM. #Diferença em relação ao grupo controle e etanol; ***diferença em relação ao grupo controle, etanol, etanol + apocinina ($p < 0,05$; ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls).

4.6.5 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a capacidade antioxidante total no plasma

A capacidade antioxidante total foi avaliada em amostras de plasma. O tratamento crônico com etanol gerou aumento da capacidade antioxidante em relação ao grupo controle. O tratamento com apocinina acentuou o aumento promovido pelo etanol (Figura 18).

Figura 18. Participação da NADPH oxidase nos efeitos do tratamento crônico com etanol sobre a capacidade antioxidante total. A atividade antioxidante total foi avaliada no plasma de animais do grupo controle (n=10), etanol (n=9), controle + apocinina (n=10) e etanol + apocinina (n=9). Os resultados são representados como a média $\pm$ EPM. *Diferença em relação ao grupo controle; #Diferença em relação ao grupo etanol; f Diferença em relação ao grupo controle + apocinina ($p < 0,05$; ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls).

4.7 Avaliação da expressão protéica

4.7.1 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a expressão protéica da Nox1, Nox2, Nox4, p47 phox e Noxo1 em aorta de ratos

A Figura 19 representa a expressão protéica da Nox1, Nox2, Nox4, p47 phox e Noxo1 em aorta de ratos. O tratamento crônico com etanol promoveu aumento da expressão da Nox1, sendo este aumento prevenido pelo tratamento com apocinina (grupo etanol + apocinina). Já a expressão das subunidades catalíticas Nox2 e Nox4 e das subunidades organizadoras p47 phox e Noxo1 não foram alteradas pelo tratamento com etanol.

Figura 19. Participação da NADPH oxidase nos efeitos do tratamento crônico com etanol sobre a expressão da Nox1, Nox2, Nox4, p47 phox e Noxo1 em artéria aorta de rato. *Painel superior:* imagens representativas da expressão da Nox1(A), Nox2(B), Nox4(C), p47 phox (D) e Noxo1 (E) obtidas por Western Blotting. *Painel inferior:* gráfico de barras demonstrando os valores expressos pela média $\pm$ EPM da densidade óptica relativa ($n = 4 - 5$) das referidas proteínas. Os valores foram normalizados pelos correspondentes de β -actina. *Diferença em relação ao grupo controle, controle + apocinina, etanol + apocinina ($p < 0,05$; ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls).

4.7.2 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a expressão protéica e fosforilação de proteínas envolvidas na ativação da NADPH oxidase em aorta de ratos

Na figura 20 estão representados os resultados correspondentes a avaliação da expressão proteica e fosforilação da PKC δ , c-Src e Rac1. O tratamento crônico com etanol promoveu aumento da expressão da PKC δ , sendo este aumento prevenido pela apocinina (grupo etanol + apocinina). Já as expressões da c-Src e Rac1 não foram alteradas pelo tratamento crônico com etanol. Não foram observadas alterações na fosforilação da PKC δ , c-Src e Rac1 pelo etanol.

Figura 20. Participação da NADPH oxidase nos efeitos do tratamento crônico com etanol sobre a expressão e fosforilação da PKC δ , c-Src e Rac1 em artéria aorta de rato. *Painel superior:* imagens representativas da expressão e fosforilação da PKC δ (A,B), c-Src (C,D) e Rac1 (E,F) obtidas por Western Blotting. *Painel inferior:* gráfico de barras demonstrando os valores expressos pela média $\pm$ EPM da densidade óptica relativa (n=4-5). Os valores foram normalizados pelos correspondentes de β -actina. *Diferença em relação ao grupo controle, controle + apocinina, etanol + apocinina (p<0,05; ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls).

4.7.3 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre translocação do citosol para membrana em artéria aorta de rato p47phox e Nox1

A Figura 21 representa a expressão das subunidades organizadoras da NADPH oxidase p47phox (A) e Nox1 (B) nas frações citosólica e de membrana em aorta dos animais dos grupos experimentais. O tratamento crônico com etanol não promoveu alteração na translocação da p47phox e Nox1 do citosol para a membrana.

Figura 21. Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a translocação da p47phox e Nox1 em artéria aorta de rato. *Painel superior:* imagens representativas de Western Blotting. *Painel inferior:* gráfico de barras demonstrando a translocação como a razão membrana/citosol da expressão da subunidade p47phox (A) e Nox1 (B). Os valores são expressos pela média $\pm$ EPM da densidade óptica relativa (n=4).

4.7.4 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a expressão das MAPK em aorta de ratos

O tratamento crônico com etanol não acarretou alteração da expressão total da MAPKp38 e ERK 1/2 no tecido estudado. Já a proteína SAPK/JNK apresentou aumento de sua expressão em aorta dos animais tratados com etanol em relação ao grupo controle.

Figura 22. Participação da NADPH oxidase nos efeitos do tratamento crônico com etanol sobre a expressão protéica de MAPK em artéria aorta de rato. *Painel superior:* imagens representativas da expressão da MAPKp38 (A), SAPK/JNK (B) e ERK1/2 (C) obtidas por Western Blotting. *Painel inferior:* gráfico de barras demonstrando os valores expressos pela média $\pm$ EPM da densidade óptica relativa ($n=4-6$). Os valores foram normalizados pelos correspondentes de β -actina. *Diferença em relação ao grupo controle, controle + apocinina e etanol + apocinina ($p<0,05$; ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls).

4.7.5 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a fosforilação das MAPK em aorta de ratos

A avaliação da fosforilação das MAPK em tecido aórtico demonstrou, como observado na Figura 23, que em aorta de animais do grupo etanol, controle + apocinina e etanol + apocinina houve diminuição da fosforilação da ERK 1/2 em relação ao grupo controle.

Figura 23. Participação da NADPH oxidase nos efeitos do tratamento crônico com etanol sobre a fosforilação de MAPK em artéria aorta de rato. *Painel superior:* imagens representativas da fosforilação da MAPKp38 (A), SAPK/JNK (B) e ERK1/2 (C) obtidas por Western Blotting. *Painel inferior:* gráfico de barras demonstrando os valores expressos pela média ± EPM da densidade óptica relativa (n=4). Os valores foram normalizados pelos correspondentes de β-actina. *Diferença em relação ao grupo Controle (p<0,05; ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls).

4.7.6 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a expressão protéica de Akt total e fosforilada em aorta de ratos

A figura 24 representa a expressão protéica total da Akt e sua respectiva fosforilação em aorta de ratos dos grupos experimentais. O tratamento com etanol não promoveu alteração na expressão da Akt, como também em sua ativação.

Figura 24. Participação da NADPH oxidase nos efeitos do tratamento crônico com etanol sobre a expressão e fosforilação da Akt em artéria aorta de ratos. *Painel superior:* imagens representativas da expressão (A) e fosforilação (B) da Akt obtidas por Western Blotting. *Painel inferior:* gráfico de barras demonstrando os valores expressos pela média $\pm$ EPM da densidade óptica relativa (n=4). Os valores foram normalizados pelos correspondentes de β -actina.

4.7.7 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a expressão protéica da nNOS, iNOS e eNOS em aorta de ratos

A figura 25 representa a expressão protéica da NO sintases, nNOS, iNOS e eNOS em aorta de ratos. O tratamento crônico com etanol promoveu aumento da expressão protéica da nNOS e o tratamento com apocinina preveniu essa resposta. O tratamento com etanol não promoveu alteração na expressão da iNOS e eNOS.

Figura 25. Participação da NADPH oxidase nos efeitos do tratamento crônico com etanol sobre a expressão da nNOS, iNOS e eNOS em artéria aorta de rato. *Painel superior:* imagens representativas da expressão da nNOS (A), iNOS (B) e eNOS (C) obtidas por Western Blotting. *Painel inferior:* gráfico de barras demonstrando os valores expressos pela média $\pm$ EPM da densidade óptica relativa ($n=4-5$). Os valores foram normalizados pelos correspondentes de β -actina. *Diferença em relação ao grupo controle, controle + apocinina, etanol + apocinina ($p<0,05$; ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls).

4.7.8 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a expressão protéica das diferentes isoformas da SOD em aorta de ratos

O tratamento crônico com etanol não alterou a expressão da SOD1 em tecido aórtico. Já em relação à SOD2 (MnSOD) foi observado aumento da expressão em aorta dos animais tratados com etanol, sendo este aumento prevenido pela apocinina. O tratamento com etanol não promoveu alteração da expressão da SOD3.

Figura 26. Participação da NADPH oxidase nos efeitos do tratamento crônico com etanol sobre a expressão da SOD1, SOD2 e SOD3 em artéria aorta de rato. *Painel superior:* imagens representativas da expressão da SOD 1(A), SOD2 (B) e SOD3 (C) obtidas por Western Blotting. *Painel inferior:* gráfico de barras demonstrando os valores expressos pela média ± EPM da densidade óptica relativa (n=4-5). Os valores foram normalizados pelos correspondentes de β - actina. *Diferença em relação ao grupo controle, controle + apocinina, etanol + apocinina (p<0,05; ANOVA seguida do teste de Newman- Keuls).

Discussão

5 DISCUSSÃO

No presente trabalho foi demonstrado que os animais tratados cronicamente com etanol apresentaram menor consumo de ração e ganho de peso quando comparados aos animais que receberam água. Estudos realizados com animais que também possuem o etanol como única fonte de líquido, inclusive na mesma concentração utilizada no presente estudo, reportaram uma diminuição do peso corporal ao longo do tratamento (Laure-Achagiotis *et al.*, 1990; Macieira *et al.*, 1997; Aguiar *et al.*, 2004). Sabe-se que o etanol é a única droga cuja oxidação pela enzima ADH fornece 7,1 kcal de energia por grama de etanol metabolizado. Porém, trata-se de uma fonte de calorias desprovida de vitaminas e minerais, sendo seu consumo crônico associado à desnutrição específica, além de promover a diminuição do consumo de alimentos e prejudicar a absorção de nutrientes (Molina *et al.*, 2003). Um fato que deve ser ressaltado é que os animais que receberam etanol juntamente com injeções de apocinina, por sua vez, apresentaram um maior ganho de peso em relação aos que não foram tratados com a substância, demonstrando assim, que a apocinina diminui os efeitos de redução no ganho de peso provocados pelo consumo crônico de etanol.

O fato de que a hipertensão arterial contribui para a morbimortalidade em doenças cardiovasculares, particularmente em países em desenvolvimento como o Brasil, já está amplamente descrito na literatura (Barreto *et al.*, 2001; Passos *et al.*, 2006). Porém os fatores de risco para seu aparecimento como também os mecanismos moleculares envolvidos não estão inteiramente elucidados. Sabe-se que a hipertensão é uma doença multifatorial, produto de interações genéticas, fisiológicas e ambientais, sendo sua patogênese associada ao aumento da resistência periférica que resulta predominantemente de alterações mecânicas, estruturais e funcionais no sistema vascular (Virdis *et al.*, 2011; Touyz, Montezano, 2012).

O padrão de consumo do etanol é um importante fator que contribui para os efeitos promovidos pela substância sobre a pressão arterial, influenciando na patogênese da referida doença

(Wannamethee, Shaper, 1993; Puddey *et al.*, 1999). Enquanto o consumo “leve” a “moderado” de etanol tem sido associado com a redução de riscos para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, seu consumo abusivo, que corresponde ao consumo maior que 3 doses por dia para mulheres e 4 doses para homens (uma dose equivale a 14 gramas de etanol), pelo contrário, é considerado um fator de risco para tal (Meister *et al.*, 2000; Klatsky *et al.*, 2001; Miller *et al.*, 2005; *National Institute of Alcohol Abuse and Alcoholism*, 2013). Em seres humanos, níveis sanguíneos de etanol de 15 mg/dl são capazes de promover alterações sutis no organismo, sendo que concentrações maiores que 400 mg/dl estão relacionadas à intoxicação alcoólica (Dubowski, 1975; Urso *et al.*, 1981). No presente trabalho, a concentração sanguínea de etanol encontrada nos animais tratados foi de aproximadamente 150 mg/dl, valor semelhante aos observados em estudos prévios com modelos animais que consomem etanol e considerado fisiopatologicamente importante por se relacionar aos efeitos prejudiciais do etanol no organismo (Husain *et al.*, 2005; Tirapelli *et al.*, 2007; Hipólito *et al.*, 2011).

A avaliação da pressão arterial dos animais foi realizada por pletismografia de cauda, método mais adequado para fins de comparação entre valores de pressão arterial basal e valores obtidos com a ação de algum composto no sistema cardiovascular (Parasuraman, Raveendran, 2012). Assim sendo, os resultados obtidos demonstraram que tratamento com etanol promoveu elevação dos valores de pressão arterial sistólica em relação aos obtidos no grupo controle. Este achado corrobora trabalhos prévios, os quais demonstram que o consumo crônico de etanol gera aumento da pressão arterial (Chan, Sutter, 1983; Chan *et al.*, 1985; Utkan *et al.*, 2001; Resstel *et al.*, 2006; Tirapelli *et al.*, 2007; Tirapelli *et al.*, 2008; Passaglia *et al.*, 2015).

Além do mais, o presente estudo demonstrou pela primeira vez, neste modelo animal de tratamento crônico com etanol, o envolvimento da enzima NADPH oxidase no aumento da pressão arterial promovida, uma vez que o tratamento com apocinina preveniu esta resposta. Há mais de duas décadas, foi estabelecida a relação de que as ERO possuem um importante papel na fisiopatologia da hipertensão arterial (Nakazono *et al.*, 1991) e, desde então, o complexo

enzimático formado pela NADPH oxidase, principal fonte de ERO na vasculatura, vem sendo cada vez mais implicado na regulação da pressão arterial (Zalba *et al.*, 2001), desempenhando importante papel em alterações estruturais vasculares (Virdis *et al.*, 2004).

Neste sentido, primeiramente, vale lembrar, da crucial função fisiológica das ERO para a manutenção da integridade cardíaca e vascular, participando do controle da função endotelial, do tônus vascular e da função cardíaca (Lassègue *et al.*, 2012). Porém, o ponto principal que correlaciona as ERO, principalmente o O_2^- , à fisiopatologia da hipertensão arterial se encontra no fato de que, em excesso, estas entidades químicas possuem participação fisiopatológica na inflamação, com envolvimento na sinalização pró-inflamatória de células endoteliais e do músculo liso, regulação de moléculas de adesão celular endotelial (VCAM- *vascular cell adhesion molecule*) e na expressão de MCP-1 (*monocyte chemotactic protein-1*), migração de monócitos, influenciando agregação plaquetária, ativação de MMPs (*matrix metallo-proteinases*), hipertrofia, proliferação, fibrose e angiogênese, processos estes implicados na disfunção endotelial e remodelamento cardiovascular (Griendling, FitzGerald, 2003; Lyle, Griendling, 2006; Takac *et al.*, 2012; Schramm *et al.*, 2012, Popolo *et al.*, 2013). A avaliação da produção de O_2^- foi realizada pelo método de quimioluminescência da lucigenina. Esta técnica tem sido amplamente utilizada para a detecção de O_2^- advindo da NADPH oxidase no sistema vascular, uma vez que para a realização do ensaio é adicionado um dos substratos da enzima, o NADPH (Munzel *et al.*, 2002). Em homogenato de aorta dos animais que receberam etanol foi observado aumento dos níveis de O_2^- , aumento este que foi prevenido pela apocinina. Além disso, por meio da utilização da sonda fluorescente DHE, foi possível visualizar *in situ* este aumento da geração de O_2^- nos cortes de aorta dos animais tratados com etanol e a prevenção deste aumento proporcionado pela apocinina. Este achado permite sugerir que, neste modelo de consumo crônico de etanol, o O_2^- , presente em excesso no tecido aórtico, tem como principal fonte enzimática a NADPH oxidase, uma vez que houve prevenção do aumento nos animais tratados com apocinina. Estudos têm demonstrado o envolvimento e contribuição da enzima NADPH oxidase para as

disfunções promovidas pelo consumo crônico de etanol (Kono *et al.*, 2000; Thakur *et al.*, 2006; Minicis, Brenner; 2008; Qin *et al.*, 2012; Yeligar *et al.*, 2012). Além disso, resultados relacionados ao aumento da expressão das isoformas da NADPH oxidase em tecidos como artéria pulmonar de camundongos (Wagner *et al.*, 2012); células neuronais (Wang *et al.*, 2012); tecido pulmonar de ratos cronicamente tratados com etanol (Polikandriotis *et al.*, 2006), macrófagos alveolares de humanos que fazem uso abusivo de etanol (Yeligar *et al.*, 2012) foram demonstrados, sugerindo que um mecanismo potencial para o estresse oxidativo induzido pelo consumo de etanol é o aumento da expressão das proteínas que compõe a família das Nox.

A partir destas observações, com a realização da técnica de *western blotting*, foram avaliados os padrões de expressão das principais subunidades catalíticas da NADPH oxidase no sistema vascular e o efeito do consumo crônico de etanol sobre a expressão de proteínas envolvidas na ativação da enzima.

Primeiramente, dentre as isoformas da NADPH avaliadas, foi possível observar aumento da expressão da Nox1 em tecido aórtico dos ratos tratados cronicamente com etanol. No sistema vascular, sabe-se que as enzimas Nox funcionam como moduladores *redox*, sendo que sua localização celular específica e compartimentalização subcelular provavelmente desempenham importante papel em suas ações específicas (Brandes *et al.*, 2014; Montezano *et al.*, 2014). A Nox1, juntamente com a Nox4, é expressa principalmente no músculo liso vascular e, dentre as demais Nox, se destaca como a principal isoforma relacionada com a patogênese da hipertensão arterial (Wingler *et al.*, 2011; Takac *et al.*, 2012). Estudos têm demonstrado aumento de sua expressão em diversos modelos animais de hipertensão arterial (Ghosh *et al.*, 2004; Jin *et al.*, 2006; Wind *et al.*, 2010). Em camundongos *knockout* para Nox1, a resposta pressora induzida pela angiotensina II não é observada e o relaxamento induzido pela acetilcolina preservado, sugerindo que as ERO derivadas da Nox1 são os principais fatores responsáveis pela disfunção endotelial observada na hipertensão induzida pela infusão de angiotensina II (Matsuno *et al.*, 2005; Gavazzi *et al.*, 2006). Já, em camundongos que superexpressam a Nox1 na vasculatura, a

pressão arterial sistólica e a hipertrofia aórtica, causadas pela infusão de angiotensina II, foram potencializadas nestes animais, indicando que a superexpressão da Nox1 aumenta a resposta oxidativa, pressora e hipertrófica da angiotensina II, apoiando o conceito de que a Nox1 possui importante papel no desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Dikalova *et al.*, 2005).

A Nox2, também chamada gp91phox, é a subunidade catalítica do complexo enzimático responsável pelo *burst* respiratório fagocítico sendo o primeiro membro da família da NADPH oxidase descoberto. No sistema vascular, é expressa principalmente no endotélio onde possui menor atividade em relação à apresentada em fagócitos (Lasségue, *et al.*, 2012). Porém, trabalhos já demonstraram o papel funcional desta enzima no desenvolvimento de estresse oxidativo, participando da patogênese de doenças vasculares quando superexpressa no endotélio, sendo capaz de ativar vias de sinalização envolvidas com o desenvolvimento de hipertensão e potencializar a resposta hemodinâmica à angiotensina II (Bendall *et al.*, 2007). No presente trabalho, em homogenato de tecido aórtico, não foi observada diferença na expressão desta isoforma da NADPH entre os grupos tratados, sugerindo que a Nox2 não possui papel significativo no aumento da pressão arterial e estresse oxidativo induzidos pelo tratamento com etanol.

Sabe-se que a Nox4 apresenta peculiaridades em relação às outras isoformas da NADPH oxidase no que diz respeito principalmente à sua atividade bioquímica, demonstrando efeitos potencialmente benéficos ao sistema cardiovascular (Ray, 2011; Touyz, 2012). Constitutivamente, esta enzima gera ERO sem a necessidade de ativação dos fatores citosólicos, como ocorre com a Nox1 e Nox2 e, ainda mais, gera predominantemente H_2O_2 a $O_2^{\cdot -}$. Da mesma forma ao observado com a Nox2, não foi encontrada diferença na expressão protéica da Nox4 em aorta dos animais tratados.

Estes resultados apóiam a hipótese de que o aumento da geração de ERO (estresse oxidativo) induzido pelo consumo de etanol está principalmete relacionado ao aumento da expressão proteica da Nox1/NADPH oxidase em aorta e estes mecanismos estão envolvidos na alteração da pressão arterial observada nos animais tratados com etanol.

Além disso, uma vez observada alteração na expressão da Nox1 e sua relação com o estresse oxidativo o presente trabalho também buscou avaliar a expressão protéica de proteínas específicas envolvidas na ativação vascular da NADPH oxidase. Neste sentido, sabe-se que um passo essencial para que se tenha a forma ativa da enzima NADPH é a fosforilação da subunidade p47phox em múltiplos sítios de serina (Ser303-Ser379) (Paravicini e Touyz, 2008). Diferentes isoformas da PKC estão envolvidas neste processo, dependendo do tipo celular e agonista envolvido, porém um papel central para PKC δ tem sido sugerido (Bey *et al.*, 2004; Lev *et al.*, 2012). Além do mais, sabe-se que a isoforma PKC δ também está envolvida nos efeitos vasculares induzidos pela angiotensina II, contribuindo para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Nakashima *et al.*, 2008). Sabe-se que a Nox1 é preferencialmente ativada por uma combinação entre Nox1 (Nox activator 1) e Noxo1, homólogos da p67 phox e p47 phox, respectivamente. Estudos que demonstram expressão induzida da Nox1 no sistema vascular sugerem envolvimento de EGF, ATF-1, PI3K e PKC δ no processo de ativação desta enzima (Fan *et al.*, 2005).

Touyz *et al.* (2003) demonstraram em células musculares lisas de humanos que a estimulação da NADPH oxidase pela angiotensina II é mediada via c-Src, altamente expressa em células musculares lisas, onde possui importante papel em eventos sinalizadores associados à contração, crescimento e migração celular. Da mesma forma, em células musculares lisas de aorta, Seshiah *et al.* (2002) demonstraram que a estimulação da NADPH oxidase pela angiotensina II é bifásica, sendo que durante a fase rápida de produção de ERO ocorre a ativação da PKC, enquanto que na fase subsequente (fase sustentada) há o envolvimento das vias de sinalização da PI3K, EGF, Rac e Src.

No presente trabalho o tratamento com etanol aumentou a expressão protéica da PKC δ , porém não foi observado alteração na fosforilação da proteína, sugerindo que o etanol não promove aumento de sua ativação. O aumento da expressão protéica da PKC δ foi prevenido pela apocinina, o que também permite sugerir participação das ERO geradas pela NADPH oxidase nesta resposta. Trabalhos demonstraram o envolvimento da PKC nas respostas vasculares

mediadas pelo etanol, no que concerne principalmente à sua participação na ativação de MAPK e respostas contráteis (Jover *et al.*, 1999; Washington *et al.*, 2003). Em 1998, Gerstin e colaboradores demonstraram, em células neurais, que a exposição crônica ao etanol é capaz de estimular canais de cálcio tipo L por um mecanismo que envolve aumento da expressão da PKC δ , demonstrando o importante papel desta quinase específica nos efeitos crônicos do etanol nestas células (Gerstin *et al.*, 1998).

Em cardiomiócitos isolados, sabe-se que o etanol é capaz de ativar apenas as isoformas PKC ϵ e PKC δ , sendo que a primeira está relacionada a efeitos protetores do etanol sobre o sistema vascular. Já a PKC δ , possui papel importante em vias ligadas às disfunções cardiovasculares induzidas pelo etanol (Chen, Mochly-Rosen; 2001).

Sabendo do importante papel da PKC δ na ativação da NADPH oxidase e da contribuição da referida enzima para as disfunções promovidas pelo consumo crônico de etanol em diferentes tecidos, sugere-se, a partir do resultado obtido, que em aorta dos animais que receberam tratamento crônico com etanol, esta quinase tenha uma participação fundamental no processo de estresse oxidativo induzido pelo etanol. Esta hipótese se apóia no fato de que não houve aumento da expressão da referida quinase nos animais que receberam tratamento com apocinina. Além disso, não foram observadas alterações na expressão e ativação da c-Src e Rac1 na aorta dos animais tratados.

Vale lembrar que, mesmo com o aumento na expressão de uma proteína envolvida na ativação da NADPH oxidase, o consumo de etanol não promoveu alteração na translocação da p47 phox e Nox1 do citosol para a membrana. Assim sendo, este resultado permite sugerir que um mecanismo potencial pelo qual o tratamento crônico com etanol induz aumento da geração de ERO via NADPH oxidase é principalmente por ser capaz de promover alteração na expressão da Nox1/NADPH e não por aumentar sua ativação.

As ERO em excesso podem agir causando danos oxidativos diretos a macromoléculas como DNA, lipídios e proteínas gerando modificação celular e citotoxicidade. Especificamente, o

O_2^- atua como importante fonte de radicais hidroperóxidos, principais envolvidos no desencadeamento da peroxidação lipídica (Aikens, Dix; 1991). Os fosfolipídios da membrana celular são particularmente suscetíveis ao processo de peroxidação, onde ocorre a incorporação do oxigênio molecular a um ácido graxo poliinsaturado, resultando em sua degradação oxidativa. Este processo acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade da membrana, resultando em perda da seletividade da troca iônica, liberação do conteúdo de organelas, tais como as enzimas hidrolíticas dos lisossomos, e formação de produtos citotóxicos, dentre eles, o malondialdeído (MDA). No presente trabalho, no plasma e no tecido aórtico de animais tratados cronicamente com etanol foi possível observar significativa elevação dos níveis de TBARS, indício de peroxidação lipídica de membranas teciduais (Husain e Somani, 1997). Sugere-se que este resultado seja advindo dos danos oxidativos ocasionados pelo excesso de O_2^- gerado pela NADPH oxidase na aorta dos animais tratados cronicamente com etanol, uma vez que nos animais tratados com apocinina não foi observado elevação dos níveis de TBARS. Além disso, como foi observado por Yogi e colaboradores (2012), o fato de que os níveis de TBARS estejam aumentados no plasma sugere que o aumento de ERO seja também um fenômeno sistêmico, não ficando restrito apenas ao tecido aórtico.

Além de atuar diretamente sobre macromoléculas, como explicitado acima, as ERO também possuem a habilidade de reagir e conseqüentemente eliminar compostos que desempenham função fisiológica no controle do tônus vascular, como o NO. Esta última interação descrita representa o principal mecanismo de disfunção endotelial, no qual células endoteliais são incapazes de promover suficiente proteção à parede vascular (Takac *et al.*, 2012). No presente trabalho, o tratamento crônico com etanol diminuiu os níveis plasmáticos e aórticos de NO e o tratamento dos animais com apocinina não preveniu esta resposta. A diminuição da biodisponibilidade de NO pode ser resultado tanto de alterações em sua produção ou, como citado, de sua inativação (Thomas *et al.*, 2003). Neste sentido, sabe-se que o tratamento crônico com etanol, segundo estudos clínicos e experimentais, pode interferir com a produção e também

com a liberação de NO das células endoteliais, sendo estes processo relacionados principalmente com a reação do NO com o O_2^- o que gera $ONOO^-$ (peroxinitrito) e pela inativação/desacoplamento da eNOS pelas ERO induzidas pelo etanol (Pinardi *et al.*, 1992; Husain *et al.*, 2007). Sabe-se que além de ser citotóxico, o $ONOO^-$ é responsável pelo aumento de agregação plaquetária e vasoconstrição, além de ser capaz de oxidar o cofator tetrahydrobiopterina (BH_4), o que gera desacoplamento de eNOS e consequente diminuição da produção de NO (Popolo *et al.*, 2013).

Portanto, sugere-se que as ERO geradas, em excesso, pelo consumo crônico de etanol são capazes de reagir com o NO tanto tecidual quanto sistematicamente e o fato do tratamento com apocinina não prevenir esta diminuição dos níveis de NO sugere que as ERO que estão reagindo com o NO possam ser advindas do próprio metabolismo do etanol ou de outro sistema enzimático (Scott *et al.*, 1999).

Neste sentido, sabe-se que o etanol é extensivamente metabolizado no fígado à acetaldeído que, por sua vez, é oxidado a acetato, processo acompanhado pela geração de radicais livres. Estes radicais livres eletrofílicos e o próprio acetaldeído reagem com grupos nucleofílicos de proteínas, fosfolípidos e ácidos nucleicos gerando mudanças em propriedades de membrana celular, prejudicando a capacidade da membrana em agir como barreira seletiva, danificando a permeabilidade iônica, atividades enzimáticas e, até mesmo, responsividade de receptores. Assim sendo, disfunções celulares causadas pelo consumo de etanol são direta ou indiretamente ligadas ao estresse oxidativo gerado (Scott *et al.*, 1999; Stańczyk *et al.*, 2005; Albano, 2006; Vucevic *et al.*, 2013). Além disso, o etanol é capaz de induzir a expressão de enzimas do citocromo P450 (CYP2E1), o que gera ERO. Em tecidos extra-hepáticos, o etanol é metabolizado pela CYP2E1 e CAT, o que também gera ERO (Zakhari, 2006).

Já no que diz respeito a outro sistema enzimático gerador de ERO, sabe-se que as ERO geradas pela NADPH oxidase podem desempenhar importante papel na modulação da produção

de ERO por outras fontes enzimáticas, como por exemplo, a eNOS desacoplada e XO (Laguesse *et al.*, 2012).

A XO é uma importante fonte de geração de O_2^- no sistema vascular, via redução da xantina ou hipoxantina a ácido úrico. Estudo demonstrou aumento da atividade da referida enzima em fígado de ratos tratados cronicamente com etanol, processo acompanhado pelo aumento de peroxidação lipídica hepática, sendo que o tratamento com alopurinol reverteu a resposta (Kato *et al.*, 1990). Além disso, dados demonstram menor atividade da XO em camundongos *knockout* para a subunidade p47phox da NADPH, o que sugere o importante papel da NADPH oxidase na atividade da enzima XO (McNally *et al.*, 2003). Neste sentido, o presente trabalho avaliou a atividade da XO, na tentativa de elucidar se o consumo crônico de etanol poderia causar alteração na atividade da enzima seja, como por exemplo, via ERO advindas da NADPH oxidase, ou mesmo via efeito direto causado pelo etanol. Porém, foi possível observar que o tratamento crônico com etanol não alterou a atividade enzimática da XO, o que demonstra que, mesmo a XO sendo uma importante fonte de ERO no sistema vascular, não está implicada no aumento de ERO pelo consumo de etanol em tecido aórtico neste modelo experimental.

O consumo crônico de etanol também é capaz de causar alteração na expressão das NOS (Toda *et al.*, 2010). Tirapelli *et al.* (2008) demonstrou que o tratamento crônico com etanol reduziu a expressão protéica da eNOS e aumentou a expressão da iNOS em aorta de ratas quando comparado ao controle. Os autores reportaram ser este um mecanismo compensatório onde o aumento da expressão da iNOS poderia induzir uma liberação sustentada e substancial de NO para compensar a redução na expressão da eNOS. Já no presente trabalho foi possível observar que o tratamento com etanol a 20% por duas semanas promoveu aumento da expressão da nNOS, não sendo observada diferenças na expressão da eNOS e iNOS. Sabe-se que a nNOS é capaz de desencadear vias regulatórias tecido-específicas na hipertensão essencial (Cacanyiova *et al.*, 2012). Boulanger e colaboradores (1998) apresentaram evidências bioquímicas e funcionais de que ocorre estimulação da nNOS após ativação do receptor AT1 pela angiotensina II em carótida

de ratos espontaneamente hipertensos (SHR), sugerindo que o aumento da expressão protéica da nNOS no músculo liso das artérias está associado ao desenvolvimento da hipertensão como uma possível forma de defesa do organismo. Já em relação ao consumo de etanol, alguns trabalhos demonstraram aumento da expressão protéica e atividade da nNOS em tecido cerebral e intestinal de ratos (Deng, Deitrich; 2007; Budec *et al.*, 2013). Assim sendo, o aumento da expressão protéica total da nNOS na aorta dos animais tratados com etanol pode ser uma resposta adaptativa intrínseca às alterações promovidas pelo aumento da pressão arterial nestes animais. Vale lembrar que este aumento da expressão da nNOS não ocorre estritamente em resposta à diminuição dos níveis de NO observado, uma vez que o tratamento com apocinina não preveniu a diminuição de NO induzida pelo etanol e em tecido aórtico do grupo etanol + apocinina não foi observado aumento da expressão da nNOS.

A proteína quinase Akt (PKB), regulador multifuncional da sobrevivência celular, é efetor da PI3K e já está bem estabelecido sua relação com a ativação da eNOS, o que leva à produção de NO. Evidências demonstram que a via PI3K/Akt/NO é *redox*-sensível, podendo ser ativada pelo aumento de ERO (Ho *et al.*, 2006) possuindo importante papel na prevenção da injúria celular endotelial induzida por ERO (Chavakis *et al.*, 2001). Neste sentido, a partir da realização de *western blotting* para o sítio de fosforilação da Akt (serina 473) como também para a sua expressão protéica total, não foi observada diferença significativa entre os grupos experimentais, o que sugere que o estresse oxidativo gerado pelo tratamento crônico com etanol neste trabalho não promoveu ativação desta via.

No tecido vascular, os principais sistemas antioxidantes enzimáticos encontrados incluem a SOD, CAT, GPx, tioredoxinas e peroxiredoxinas. Já os antioxidantes não enzimáticos incluem o ascorbato, tocoferóis, glutatona, bilirrubina e ácido úrico (Gongora *et al.*, 2005; Tajima *et al.*, 2009).

A SOD é considerada a primeira linha de defesa contra os efeitos deletérios dos radicais livres, por catalisar a dismutação do O_2^- e produzir H_2O_2 e O_2 . Sabe-se que, em mamíferos, há três formas existentes da SOD, que varia de acordo com o conteúdo metálico presente: Cu-ZnSOD

(SOD1), localizada principalmente no citoplasma, Mn-SOD (SOD2) e eSOD (SOD3), extracelular. Em seres humanos, a SOD é uma enzima principalmente intracelular, sendo que pequenas quantidades da enzima estão presentes em fluidos extracelulares, como plasma, líquido cefaloraquidiano e sinovial (Popolo *et al.*, 2013). A reação do O_2^- com a SOD, na presença de quantidade suficiente da enzima, sob atividade adequada, mantém os níveis de O_2^- baixos. A SOD deve estar presente no mesmo compartimento celular no qual, e quando, a produção de O_2^- ocorre.

No presente trabalho, o tratamento crônico em etanol promoveu aumento da expressão da SOD2 em tecido aórtico. A SOD2, localizada na matriz mitocondrial, diferentemente da SOD1 que é constitutivamente expressa, é uma enzima induzida por diferentes agentes tais como citocinas, drogas auto-oxidáveis e radiação ionizante, possuindo papel primordial no controle dos níveis de ERO intramitocondriais (Koch *et al.*, 2000). Em tecido hepático de ratos, foi demonstrado aumento da expressão gênica da SOD2 após tratamento crônico com etanol. Os autores sugeriram ser este um mecanismo adaptativo específico frente a uma condição de estresse oxidativo pelo aumento da geração de ERO (Koch *et al.*, 1994; Koch *et al.*, 2000). Em células do epitélio intestinal de humanos, a exposição ao etanol promoveu aumento da expressão da SOD2, indicando participação do estresse oxidativo nos danos intestinais causados pelo etanol (Park *et al.*, 2012). Assim sendo, o resultado obtido neste trabalho demonstra que a SOD2 está sofrendo modulação em resposta ao estado *redox* aórtico promovido pelo tratamento crônico com etanol, uma vez também que esta resposta de aumento da expressão protéica foi prevenida pela apocinina.

O método utilizado no presente trabalho para avaliar a atividade da enzima SOD engloba a avaliação das três isoformas citadas. Foi possível observar que, no plasma, o tratamento com etanol diminuiu a atividade da enzima e o tratamento com apocinina preveniu este efeito. Estudo recente em humanos que consumiam quantidade superior a 80 gramas de etanol diariamente apresentou o perfil de atividade antioxidante no soro destes pacientes, onde foi possível observar diminuição da atividade da SOD e GPx nos alcoólatras em relação aos sujeitos saudáveis (Rua *et al.*, 2014). Em tecido aórtico de animais tratados com etanol, foi demonstrado diminuição da atividade da Cu-ZnSOD e Mn-SOD e

sugere-se que esta resposta se deva ao aumento do influxo de O_2^- , que por sua vez, reage com o NO para formar ONOO⁻, gerando diminuição da atividade enzimática citosólica e mitocondrial, respectivamente (Husain *et al.*, 2007). Vale ressaltar que a constante de velocidade de reação do O_2^- com o NO é três vezes maior do que a constante da reação do O_2^- com a SOD e a taxa de reação enzimática, por sua vez, fornece informação sobre a contribuição de cada reação para a resposta final a uma específica espécie reativa (Estévez, Jordán; 2002). Diversos trabalhos reportam que os efeitos do consumo do etanol sobre o sistema antioxidante enzimático, principalmente a SOD, possuem caráter heterogêneo, dependente de características intrínsecas ao animal, como idade e linhagem, do tempo de tratamento, tipo de exposição e da concentração de etanol utilizada (Ledig *et al.*, 1981; Vucevic *et al.*, 2013). Como exemplo, em 1989, Schisler e Singh utilizaram diferentes linhagens de camundongos e ratos Sprague-Dawley tratados com etanol a 15% por duas semanas para avaliar a atividade de enzimas antioxidantes. Tanto a atividade da Cu-ZnSOD quanto a da MnSOD diminuíram após o tratamento crônico em etanol, sendo que o grau de diminuição foi alterado de forma dependente da linhagem do camundongo e pela concentração de etanol utilizada, no caso dos ratos. Os autores descrevem que um mecanismo potencial subjacente a esta alteração pode estar relacionado à interação do substrato O_2^- e o produto da reação enzimática H_2O_2 , o que leva a produção de OH^- , o que por sua vez pode causar danos diretos a enzima SOD, diminuindo sua eficiência *in vivo*. Schlorff (1999), administrando a ratos Fischer concentrações de 2, 4 e 6 g/kg de etanol, observaram diminuição da atividade da SOD em 41%, 56% e 71% do controle respectivamente, o que indica esta diminuição ser dose-dependente. Estes trabalhos estão de acordo no que diz respeito ao fato de que o etanol influencia a geração de ERO e tem a capacidade de modificar o *status* antioxidante celular.

Feito estas observações, é possível sugerir que a NADPH oxidase é a principal fonte geradora de O_2^- responsável pela diminuição da atividade da SOD pelo etanol, uma vez que houve prevenção desta resposta pelo tratamento com apocinina.

A glutathiona é um tripeptídeo e representa o mais proeminente tiol de baixo peso molecular presente nas células. Por ser um agente redutor intracelular, desempenha importante

papel na detoxificação celular de ERO diretamente, por exemplo, reagindo com OH^- (produto resultante da reação de Fenton), N_2O_3 e ONOO^- (produtos citotóxicos formados pela reação do O_2^- com O_2 e NO , respectivamente) (Griffith, 1999) ou por mecanismo catalisado pela GPx. Esta enzima protege o organismo do estresse oxidativo por catalizar a redução do H_2O_2 via oxidação de GSH ao dímero GSSG (dissulfido oxidado). Este processo é complementado pela enzima glutathione redutase (GR), a qual recicla GSSG a GSH. Em condições de estresse oxidativo, para manter o balanço *redox*, o GSSG é exportado da célula por proteínas transportadoras dependentes de ATP, implicando que, em condições severas de estresse oxidativo, ocorre a depleção dos níveis de GSH (Cnubben *et al.*, 1996).

Trabalhos demonstram, em soro de indivíduos que consomem regularmente etanol, diminuição da atividade da GPx comparado à atividade da referida enzima em soro de sujeitos saudáveis (Rua *et al.*, 2014; Rendon-Ramirez *et al.*, 2013). Além disso, no que se refere a trabalhos experimentais, encontra-se descrito, em ratos tratados com etanol (30%) por 37 dias, diminuição dos níveis de GSH (Singh *et al.*, 2012), como também diminuição da atividade da GPx em ratos tratados com etanol por 12 semanas em relação a animais controle (Husain *et al.*, 2004). Porém no presente estudo, o tratamento crônico com etanol a 20% por duas semanas não causou alteração nos níveis de GSH, como também na atividade enzimática da GPx. Por outro lado, foi evidenciado que o tratamento com apocinina elevou os níveis de GSH tanto no plasma quanto na aorta dos ratos que receberam a droga. Neste sentido, Lapperre e colaboradores (1999) demonstraram aumento intracelular dos níveis de GSH em células epiteliais alveolares após exposição à apocinina em concentrações similarmente alcançadas em experimentos *in vivo*, sem alteração dos níveis de GSSG, sugerindo que a apocinina por si só não causa estresse oxidativo. Já, em músculo cardíaco de ratos, foi demonstrado aumento dos níveis de GSH após tratamento com apocinina, sugerindo que a apocinina pode modular a defesa antioxidante cardíaca pela elevação do *status redox* de glutathione no tecido estudado (Kleniewska *et al.*, 2013).

Meng e colaboradores (2011), utilizando fígado de camundongos obesos resistentes a insulina alimentados com dieta rica em gordura (*high-fat diet*, HFD) encontraram efeito parecido. O conteúdo de GSH, diminuído nos animais obesos, aumentou acentuadamente após o tratamento com apocinina, sugerindo que a droga pode melhorar a resistência a insulina por reduzir o estresse oxidativo hepático, uma vez que também foi evidenciado aumento na atividade da SOD e diminuição dos níveis de MDA na circulação dos animais tratados. Este mesmo trabalho demonstrou que o tratamento com apocinina diminuiu a atividade da CAT hepática e a partir deste achado sugeriu que a apocinina reduz os níveis de H_2O_2 hepáticos e também o estresse oxidativo (Meng *et al.*, 2011). Já no presente trabalho, foi observado aumento da atividade da CAT na aorta dos animais tratados com apocinina, resultado não encontrado no plasma, sugerindo ser este aumento apenas tecidual e não sistêmico.

Vale ressaltar que o H_2O_2 , formado pela dismutação do O_2^- , pode exercer efeitos prejudiciais nas células, quando em grandes quantidades, principalmente pelo fato de ser capaz de produzir OH^- . Alterações nas atividades das principais enzimas que regulam a concentração intracelular de H_2O_2 , dentre as quais, CAT e GPx, resulta principalmente em intensiva conversão de H_2O_2 a OH^- , o que contribui para o estabelecimento do estresse oxidativo nas células. Porém como já mencionado, no presente trabalho, o tratamento com etanol não alterou a atividade da CAT e da GPx. Além disso, também não foi observada alteração dos níveis de H_2O_2 aórtico entre os grupos experimentais, resultado este, visualizado *in situ* em cortes de aorta com a utilização da sonda fluorescente DCFH-DA, utilizada para a detecção de H_2O_2 intracelular (Dikalov *et al.*, 2007).

A capacidade antioxidante total consiste em um equilíbrio dinâmico influenciado pela interação entre cada constituinte antioxidante presente em determinada amostra (Koracevic *et al.*, 2001). No presente estudo, a capacidade antioxidante total plasmática está aumentada nos animais tratados com etanol, sendo o aumento acentuado pelo tratamento com apocinina. Young (2001) relatou que, paradoxalmente, as diversas formas existentes para a avaliação da capacidade

antioxidante total não são capazes de avaliar de forma completa a capacidade antioxidante presente nas amostras, excluindo principalmente a contribuição dos sistemas enzimáticos. Sabe-se que fluidos biológicos contêm diversas substâncias potencialmente antioxidantes, dentre as quais, o ascorbato, tocoferóis, glutathione, bilirrubina, ácido úrico, carotenóides, flavonóides. Sugere-se que o aumento observado nos animais tratados com etanol seja uma resposta adaptativa de alguma substância antioxidante específica avaliada na técnica utilizada, uma vez que na avaliação de sistemas antioxidantes específicos, como descrito acima, foi possível observar que o tratamento com etanol não promove aumento de suas atividades, a não ser o tratamento com apocinina. Este é um importante achado em vista dos efeitos deletérios simultâneos causados pelo aumento de ERO aos constituintes celulares frente ao consumo de etanol. Assim sendo, o resultado de aumento da atividade antioxidante total plasmática sugere que seja este um mecanismo de proteção do organismo frente ao aumento de ERO promovidas pelo tratamento com etanol.

Estes resultados, em conjunto, sugerem que o principal mecanismo subjacente ao estresse oxidativo e desbalanço *redox* causado pelo tratamento com etanol relaciona-se com o O_2^- advindo da NADPH oxidase e a alteração da defesa antioxidante promovida pela SOD.

A via das MAPK é um importante sistema de sinalização celular, desempenhando papel essencial na transdução sequencial de sinais biológicos da membrana celular para o núcleo (Brown, Sacks; 2009). Diversas funções celulares, desde a sobrevivência à morte celular, são reguladas pela sinalização das MAPK e atualmente seu importante papel na patogênese de doenças cardíacas e vasculares vem sendo estudado (Aroor *et al.*, 2004; Muslin, 2008). Diversos estímulos, tanto intra quanto extracelulares, têm sido implicados na ativação das MAPK em nível celular, sendo que específicos tipos de ativação e consequente regulação são relacionados a diferentes estímulos. No presente estudo, dentre os três bem definidos subgrupos de MAPK, a expressão total da quinase c-jun N-terminal ou quinase ativada por estresse (SAPK/JNK) foi maior em aorta do grupo de animais que consumiram etanol cronicamente. Esta proteína pode ser ativada por citocinas, receptores ativados por agentes que interferem com a síntese de DNA e

proteínas, fatores de crescimento e diversos outros estímulos estressantes (Bogoyevitch *et al.*, 2010). Uma vez ativada, desempenha importantes funções relacionadas à hiperplasia e hipertrofia vascular associadas à hipertensão (Touyz, 2005). A partir da observação de que as vias das MAPK medeiam sinais ativados por estresse, houve aumento do interesse da regulação destas vias pelas ERO e já se sabe que estes são capazes de ativar vias específicas das MAPK (McCubrey *et al.*, 2006; Son *et al.*, 2011). Sabe-se a p38MAPK e SAPK/JNK compartilham membros da família da MEK, implicadas na cascata de ativação das MAPK. Matsuza e Ichijo (2008) demonstraram que a ativação da SAPK/JNK mediada pelo estresse oxidativo envolve a oxidação de proteínas redox - sensíveis que se dissociam da MAP/ERK quinase (MEK) e, por conseguinte ocorre ativação da SAPK/JNK. Sendo assim, mesmo ainda não totalmente elucidado, um mecanismo plausível para a ativação de MAPK pelas ERO seria sua capacidade de modificação oxidativa de proteínas sinalizadoras, alterando estruturas e o próprio funcionamento destas (Thannickal *et al.*, 2000). Neste contexto, vale ressaltar, que a aorta de animais que foram tratados com etanol, porém que também receberam o tratamento com apocinina, não apresentou aumento de expressão protéica da SAPK/JNK. Este resultado permite sugerir que o aumento da expressão de SAPK/JNK devido ao consumo crônico de etanol é devido, em parte, ao aumento das ERO gerado, que por sua vez, foi capaz de induzir ou mediar a ativação da SAPK/JNK.

Da mesma forma, também foi demonstrado que o consumo crônico de etanol diminuiu a ativação da ERK 1/2, resultado também encontrado em tecido hepático após tratamento crônico de animais com etanol (Chen *et al.*, 1998). Sabe-se que a via da ERK1/2 é ativada pela MEK via Raf que tem sua ativação mediada por receptores tirosina quinases, como o EGF, modulados de forma ligante independente ou por fatores de crescimento, sendo, portanto, eventos sequenciais de fosforilação distintos aos da SAPK/JNK e MAPK p38. Além do mais, a ativação desta via é geralmente relacionada à sobrevivência celular pela ativação de vias sinalizadoras anti-apoptóticas, enquanto a ativação da p38 e SAPK/JNK associada a eventos de morte celular (Brunet *et al.*, 2001; Ruffels *et al.*, 2004). O'Rourke e colaboradores (1997) demonstraram que o

tratamento crônico com etanol causa supressão da ativação da ERK induzida pelo EGF. Da mesma forma, este resultado pode ser devido, em parte, à inativação de ERK1/2 via MKP-1 (proteína quinase fosfatase-1). Esta quinase modula negativamente a atividade de MAPK e se sabe que o aumento da geração de ERO e o estresse oxidativo aumentam a expressão de MKP-1 (Racz *et al.*, 2010). No entanto, o tratamento com apocinina também foi capaz de diminuir a ativação de ERK1/2. Neste sentido, é sabido que o aumento da capacidade antioxidante bloqueia a ativação de vias específicas de MAPK (Ruffels *et al.*, 2004). Sendo assim, é possível sugerir que a diminuição da fosforilação da ERK 1/2 pelo tratamento com apocinina pode ser explicada pelo aumento do *status* antioxidante promovido pela droga que aumentou os níveis de GSH e atividade da CAT em tecido aórtico.

Os estudos de reatividade vascular realizados no presente trabalho demonstraram que o tratamento crônico com etanol por duas semanas promoveu aumento da contração induzida por fenilefrina, tanto em anéis com, quanto em anéis sem endotélio. Este achado corrobora resultados anteriores que demonstraram associação entre o consumo de etanol e aumento da reatividade vascular, tanto em artérias de condutância, como aorta, quanto em vasos de resistência (Pinardi *et al.*, 1992; Stewart *et al.*, 1999; Hatton *et al.*, 1992; Ladipo *et al.*, 2002; Tirapelli *et al.*, 2006a). Além disso, no presente trabalho foi demonstrada a importante participação das ERO geradas pela NADPH oxidase no aumento da contração induzida por fenilefrina em anéis de aorta de animais tratados com etanol, uma vez que o tratamento com apocinina promoveu diminuição da contração observada, restaurando os valores para semelhantes aos observados em aortas de animais controle.

Encontra-se bem estabelecido o fato de que o etanol causa alteração da reatividade vascular via aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular. Nesse sentido, sabe-se que as ERO, através da sinalização *redox*, induzem processos fisiológicos variados que inclui modulação de vias de sinalização de Ca^{2+} , com elevação transiente da concentração e mobilização intracelular do íon e modulação de cascatas moleculares responsáveis pelo transporte de Ca^{2+} através de membranas. Além disso, as ERO modulam a concentração de Ca^{2+} intracelular na vasculatura por

modificações de proteínas responsáveis pela entrada e liberação de Ca^{2+} de seus respectivos locais de armazenamento (Berridge *et al.*, 2003; Drummond *et al.*, 2011).

A contração induzida por KCl, agente despolarizante que não utiliza receptores para induzir seu efeito vasoconstritor (Berridge *et al.*, 2003), não foi alterada entre os grupos experimentais, corroborando o estudo realizado por Utkan (2001) em animais tratados com etanol cronicamente. Este resultado demonstra que o tratamento crônico com etanol não gera alterações no influxo de Ca^{2+} do meio extracelular, não afetando a função contrátil da musculatura lisa vascular (Brizzolara *et al.*, 1995; English, 2000).

Da mesma forma, a resposta de relaxamento promovida tanto pela acetilcolina quanto pelo NPS não foi afetada pelo tratamento com etanol empregado no presente estudo. Sabe-se que a acetilcolina promove relaxamento de forma dependente do endotélio, ativando os receptores muscarínicos do tipo 3 (M_3) presentes nas células endoteliais. Os resultados obtidos com a acetilcolina estão de acordo com os descritos por Tirapelli e colaboradores (2007), onde o tratamento realizado durante duas semanas com etanol também não alterou a resposta vasodilatadora promovida em aorta de ratos. Já a resposta de relaxamento independente do endotélio induzida pelo NPS, um doador de NO, está de acordo com o estudo de Utkan (2001) e demonstra que a responsividade da aorta a efeitos que são mediados pelo NO não são alterados pelo tratamento crônico com etanol. Sendo assim, os resultados de relaxamento vascular obtidos sugerem que o tratamento crônico com etanol por duas semanas não altera a síntese e/ou liberação do NO tecidual, não causando prejuízo na via de sinalização envolvida na resposta vascular a essa molécula.

Conclusão

6 CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstrou pela primeira vez o envolvimento da NADPH oxidase no aumento da pressão arterial induzida pelo consumo crônico de etanol neste modelo de tratamento. O tratamento com etanol gera estresse oxidativo vascular via participação das ERO geradas pela NADPH oxidase, promove redução da biodisponibilidade de NO plasmático e tecidual e peroxidação lipídica. Também foi demonstrado que a enzima NADPH oxidase está envolvida no aumento da expressão proteica da PKC δ e SAPK/JNK, e que o etanol é capaz de diminuir a atividade enzimática das SOD e aumentar a expressão protéica especificamente da SOD2, possível resposta adaptativa ao aumento de geração de ERO via NADPH oxidase pelo etanol. Também foi observado aumento na expressão protéica da nNOS, sendo esta última, uma possível resposta às alterações promovidas pelo aumento da pressão arterial nestes animais. Além disso, a partir da avaliação da expressão protéica das subunidades catalíticas da NADPH oxidase, Nox1, Nox2 e Nox4, conclui-se que a Nox1 possui importante papel na modulação da geração de ERO pelo consumo de etanol, podendo levar à ativação da sinalização redox via modificações oxidativas em proteínas vasculares. Este processo pode causar alterações de crescimento celular, influenciar remodelamento vascular e contribuir para o aumento da pressão arterial observado no estudo.

Referências

7 REFERÊNCIAS

- Aguiar, A.S., Da-Silva, V.A., Boaventura, G.T. (2004). Can calories from ethanol contribute to body weight preservation by malnourished rats? *Braz J Med Biol Res*, 37(6):841-46.
- Aguiar, A.S., Boaventura, G.T., Abrahão, R.F., Freitas, T.L., Takiya, C.M., Soares-Filho, P.J., et al. (2009). Ethanol in low chronic dose level attenuates major organic effects in malnourished rats. *Biol Res*. 42(1):31-40.
- Albano E. (2006). Alcohol, oxidative stress and free radical damage. *Proc Nutr Soc*. 65: 278–290.
- Aroor, A.R., Shukla, S.D. (2004). MAPkinase signaling in diverse effects of ethanol. *Life Sciences*. 7:42339–2364.
- Aikens, J., Dix, T.A. (1991). Perhydroxyl radical (HOO.) initiated lipid peroxidation. The role of fatty acid hydroperoxides. *The Journal of Biological Chemistry*, 266, 15091-15098.
- Barreto, M.S., Passos, V.M.A., Firmo, J.O.A., Guerra, H.L., Vidigal, P.G., Lima-Costa, M.F. (2001). Hypertension and clustering of cardiovascular risk factors in a community of southeast Brazil – the Bambuí Health and ageing study. *Arq Bras Cardiol*; 77:576-81.
- Bäumer, A.T., Krüger, C.A., Falkenberg, J., Freyhaus, H.T., Rösen, R., Fink, K., Rosenkranz, S. (2007). The NADPH Oxidase Inhibitor Apocynin Improves Endothelial NO/Superoxide Balance and Lowers Effectively Blood Pressure in Spontaneously Hypertensive Rats: Comparison to Calcium Channel Blockade. *Clinical and Experimental Hypertension*, 29:287–299.
- Belambri, S.A., Hurtado-Nedelec, M., Senator, A., Makni-Maalej, K., Fay, M., Gougerot-Pocidalo, M.A., Marie, J.C., Dang, P.M., El-Benna, J. (2012). Phosphorylation of p47phox is required for receptormediated NADPH oxidase/NOX2 activation in Epstein-Barr virus-transformed human B lymphocytes. *Am J Blood Res*. 2(3):187-193.
- Bendall, J.K., Rinze, R., Adlam, D., Tatham, A.L., De Bono, J., Wilson, N., Volpi, E., Channon, K.M. (2007). Endothelial Nox2 overexpression potentiates vascular oxidative stress and hemodynamic response to angiotensin II: studies in endothelial-targeted Nox2 transgenic mice. *Circ Res*, 100(7):1016-25.
- Berridge, M.J., Bootman, M.D., Roderick, H.L. (2005). Calcium signaling: dynamics, homeostasis and remodeling. *Nature*, 4, 517-529.
- Bey, E. A., Xu, B., Bhattacharjee, A., Oldfield, C. M., Zhao, X., Li, Q., Subbulakshmi, V., Feldman, G. M., Wientjes, F. B., Cathcart, M. K. (2004). Protein kinase C is required for p47phox phosphorylation and translocation in activated human monocytes. *J. Immunol*. 173, 5730 – 5738.

Brandes, R.P., Weissmann, N., Schröder, K. (2014). Redox-mediated signal transduction by cardiovascular Nox NADPH oxidases. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 73:70-9.

Brasil. Secretaria Nacional de Políticas sobre Drogas Drogas: cartilha álcool e jovens / Secretaria Nacional de Políticas sobre Drogas; conteúdo e texto original : Beatriz H. Carlini. - 2.ed. reimpr. Brasília : Ministério da Justiça, Secretaria Nacional de Políticas sobre Drogas, 2011.

Brizzolara, A.L., Stewart-Lee, A., Burnstock, G. (1994). Responses of Rabbit Basilar Arteries to Vasoconstrictor and Vasodilator Agents: The Effects of Atherosclerosis, Age and Sex. *J Vasc Res*, 31:106-113.

Brown, M.D., Sacks, D.B. (2009). Protein scaffolds in MAP kinase signaling. *Cellular Signalling*, 21(4), 462–469.

Bogoyevitch, M.A., Ngoei, K.R.W., Zhao, T.T., et al. (2010). c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling: recent advances and challenges. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1804(3), 463–475.

Boulanger, C.M., Heymes, C., Benessiano, J., Geske, R.S., Lévy, B.I., Vanhoutte, P.M. (1998). Neuronal nitric oxide synthase is expressed in rat vascular smooth muscle cells: activation by angiotensin II in hypertension. *Circ Res*, 83(12):1271-8.

Brunet, A., Datta, S.R., Greenberg, M.E. Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI-3K-Akt signaling pathway. (2001). *Curr. Opin. Neurobiol.* 11, 297–305.

Bubolz, AH, Mendoza, SA, Zheng, X., Zinkevich, NS., Li, R., Gutterman, DD., Zhang, D.X. (2012). Activation of endothelial TRPV4 channels mediates flow-induced dilation in human coronary arterioles: role of Ca²⁺ entry and mitochondrial ROS signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 302: H634–H642.

Budec, M., Markovic, D., Vignjevic, S., Mitrovic, O., Dikic, D., Koko, V., Cokic, V.P. (2013). Neuronal nitric oxide synthase mediates the effect of ethanol on IgA. *Alcohol*, 48(1):53-8.

Cacanyiova, S., Kristek, F., Malekova, M., Ondrias, K. (2012). Effects of chronic neuronal nitric oxide-synthase inhibition on arterial function and structure in spontaneously hypertensive rats. *J Physiol Pharmacol*. 63(1):23-8.

Cadenas, E., Sies, H. (1985). Oxidative stress: excited oxygen species and enzyme activity. *Adv Enzyme Regul*, 23, 217-237.

Callera, G.E., Montezano, A.C., Yogi, A., Tostes, R.C., He, Y., Schiffrin, E.L., Touyz, R.M. (2005). c-Src-dependent nongenomic signaling responses to aldosterone are increased in vascular myocytes from spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 46, 1032-8.

- Callera, G.E., Tostes, R.C., Yogi, A., Montezano, A.C., Touyz, R.M. (2006). Endothelin-1-induced oxidative stress in DOCA-salt hypertension involves NADPH-oxidase-independent mechanisms. *Clin. Sci. (Lond.)* 110 (2), 243–253.
- Chan, T.C., Sutter, M.C. (1983). Ethanol consumption and blood pressure. *Life Sci.* 33(20):1965-73.
- Chan, T.C., Wall, R.A., Sutter, M.C. (1985). Chronic ethanol consumption, stress, and hypertension. *Hypertension*;7:519-524.
- Chen, J., Ishac, E.J.N., Dent, P., Kunos, G., Gao, B. (1998). Effects of ethanol on mitogen activated protein kinase and stressactivated protein kinase cascades in normal and regenerating liver. *Biochem. J.* 334, 669–676.
- Chen, C., Mochly-Rosen, D. (2001). Opposing Effects of and PKC in Ethanol-induced Cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol*, 33, 581–585.
- Chowdhury, A.K., Watkins, T., Parinandi, N.L., Saatian, B., Kleinberg, M.E., Usatyuk, P.V., Natarajan, V. (2005). Src-mediated tyrosine phosphorylation of p47phox in hyperoxia-induced activation of NADPH oxidase and generation of reactive oxygen species in lung endothelial cells. *J Biol Chem.* 280(21):20700-11.
- Clark, V.A., Chapman, J.M., Coulson, A.H. (1967). Effects of various factors on systolic and diastolic blood pressure in the Los Angeles heart study. *J Chronic Dis*; 20: 571-581.
- Cnubben, N.H., Rietjens, I.M., Wortelboer, H., Van Zanden, J., Van Bladeren, P.J. (2001). The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. *Environ Toxicol Pharmacol.*;10(4):141-52.
- Dikalova, A., Clemmus, R., Lassègue, B., Cheng, G., McCoy, J., Dikalov, S., et al. (2005). Nox1 overexpression potentiates angiotensin II-induced hypertension and vascular smooth muscle hypertrophy in transgenic mice. *Circulation*; 112:2668-2676.
- Dikalov, S., Griendling, K.K., Harrison, D.G. (2007). Measurement of Reactive Oxygen Species in Cardiovascular Studies. *Hypertension*;49:717-727.
- Deng, X.S., Deitrich, R.A. (2007). Ethanol metabolism and effects: nitric oxide and its interaction. *Curr Clin Pharmacol.*;2(2):145-53.
- Drummond, G.R., Selemidis, S., Griendling, K.K., Sobey, C.G. (2011). Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov.* 10(6): 453–471.

Dubowski, K.M. (1975). Stages of acute alcoholic influence/intoxication: Chemical test training school student manual. *North Dakota State Toxicology Laboratory*, 43.

Eguchi, S., Numaguchi, K., Iwasaki, H., Matsumoto, T., Yamakawa, T., Utsunomiya, H., et al. (1998). Calcium-dependent epidermal growth factor receptor transactivation mediates the angiotensin II-induced mitogen-activated protein kinase activation in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.*, 273(15), 8890-6.

Elmarakby, A.A., Loomis, E.D., Pollock, J.S., Pollock, D.M. (2005). NADPH oxidase inhibition attenuates oxidative stress but not hypertension produced by chronic ET-1. *Hypertension*, 45, 283–287.

English, K.M., Jones, R.D., Jones, T.H., Morice, A.H., Channer, K.S. (2000). Aging reduces the responsiveness of coronary arteries from male Wistar rats to the vasodilatory action of testosterone. *Clinical Science*, 99, 77-82.

Estévez, A.G., Jordán, J. (2002). Nitric Oxide and Superoxide, a Deadly Cocktail, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 962: 207–211.

Fan, C., Katsuyama, M., Nishinaka, T., Yabe-Nishimura, C. (2005). Transactivation of the EGF receptor and a PI3 kinase-ATF-1 pathway is involved in the upregulation of NOX1, a catalytic subunit of NADPH oxidase. *FEBS Lett* 579: 1301–1305.

Fan, R., Shan, X., Qian, H., Song, C., Wu, G., Chen, Y., et al. (2012). Protective effect of apocynin in an established alcoholic steatohepatitis rat model. *Immunopharmacology and immunotoxicology*. 34(4):633-638.

Fuchs, F.D., Chambless, L.E., Whelton, P.K., Nieto, F.J., Heiss, G. (2001). Alcohol consumption and the incidence of hypertension. The atherosclerosis risk in communities study. *Hypertension*, 37, 1242-50.

Gavazzi, G., Banfi, B., Deffert, C., Fiette, L., Schappi, M., Herrmann, F. et al. (2006). Decreased blood pressure in NOX1-deficient mice. *FEBS Lett* 580: 497–504.

Ghosh, M., Wang, H. D., McNeill, J. R. (2004). Role of oxidative stress and nitric oxide in regulation of spontaneous tone in aorta of DOCA-salt hypertensive rats. *British Journal of Pharmacology*, 141(4), 562–573.

Gerstin, E.H., McMahon, T. Dadgar, J., Messing, R.O. (1998). Protein Kinase C Mediates Ethanol-induced Up-regulation of L-type Calcium Channels. *J. Biol. Chem.* 273:16409-16414.

Griendling, K.K., Fitzgerald, G.A. (2003). Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation* 108, 1912–1916.

- Griffith, O.W. (1999). Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radical Biology & Medicine*, 27(9/10), 922–935.
- Gongora, M.C., Qin, Z., Laude, K., Kim, H.W., Mccann, L., Folz, J.R., et al. (2006). Role of extracellular superoxide dismutase in hypertension. *Hypertension*; 48: 473–481.
- Hamilton, C.A., Brosnan, M.J., McIntyre, M., Graham, D., Dominiczak, A.F. (2001). Superoxide Excess in Hypertension and Aging: A Common Cause of Endothelial Dysfunction *Hypertension*; 37:529-534.
- Hamilton, C.A., Brosnan, M.J., Al-Benna, S., Berg, G., Dominiczak, A.F. (2002). NADPH Oxidase Inhibition Improves Endothelial Function in Rat and Human Blood Vessels. *Hypertension*;40:755-762.
- Hatton, D.C., Bukoski, R.D., Edagr, S., Mccarron, D.A. (1992). Chronic alcohol consumption lowers blood pressure but enhances vascular contractility in Wistar rats. *J. Hypertension*, 10, 529-37.
- Hayashi, T., Juliet, P. A., Kano-Hayashi, H., Tsunekawa, T., Dingqunfang, D., Sumi, D., (2005). NADPH oxidase inhibitor, apocynin, restores the impaired endothelialdependent and -independent responses and scavenges superoxide anion in rats with type 2 diabetes complicated by NO dysfunction. *Diabetes, Obesity & Metabolism*, 7, 334–343.
- Hernandez-Hernandez, R., Armas-Padilla, M.C., Armas-Hernandez, M.J., Velasco, M. (1998). The prevalence of hypertension and the state of cardiovascular health in Venezuela and surrounding nations. *Ethn. Dis.*,4(3), 398-405.
- Hipólito, U.V., Rocha, J.T., Martins-Oliveira, A., Tirapelli, D.P., Jacob-Ferreira, A., Batalhão, M.E., et al. (2011). Chronic ethanol consumption reduces adrenomedullin-induced relaxation in the isolated rat aorta. *Alcohol*.;45(8):805-14.
- Ho, F.M., Lin, W.W., Chen, B.C., Chao, C.M., Yang, C.R., Lin, L.Y., et al. (2006). High glucoseinduced apoptosis in human vascular endothelial cells is mediated through NF-kappaB and c-JunNH2 terminal kinase pathway and prevented by PI3K/Akt/eNOS pathway. *Cell Signal*.;18(3):391-9.
- Hougee, S., Hartog, A., Sanders, A., Graus, Y.M., Hoijer, M.A., Garssen, J., et al. (2006). Oral administration of the NADPH-oxidase inhibitor apocynin partially restores diminished cartilage proteoglycan synthesis and reduces inflammation in mice. *Eur. J. Pharmacol*, 531,264–269.
- Huang, Y., Yan, L., Rong, S., Haller, H., Kirch, T. (2012). TNF- α Induces Endothelial Dysfunction via PKC- ζ -dependent NADPH Oxidase Activation. *J Huazhong Univ Sci Technol*. 32(5):642-7.

- Husain K, Mejia J, Lalla J, Kazim S. (2004). 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.*, 9(4):229-34.
- Husain, K., Scott, B.R., Reddy, S.K., Somani, S.M. (2001). Chronic ethanol and nicotine interaction on rat tissue antioxidant defense system. *Alcohol*; 25(2):89-97.
- Husain, K., Vazquez-Ortiz, M., Lalla, J. (2007). Down regulation of aortic nitric oxide and antioxidant systems in chronic alcohol-induced hypertension in rats. *Hum. Exp. Toxicol.*, 26(5),427-34.
- Husain, K., Somani, S.M. (1997). Interaction of exercise training and chronic ethanol ingestion on hepatic and plasma antioxidant system in rat. *J Appl Toxicol.* 17(3):189-94.
- Hwang, S.Y, Siow, Y.L., Au-Yeung, K.K., House, J., O, K. (2011). Folic acid supplementation inhibits NADPH oxidase-mediated superoxide anion production in the kidney. *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* 300: F189-F198.
- Jaulmes, A., Sansilvestri-Morel, P., Rolland-Valognes, G., Bernhardt, F., Gaertner, R., Lockhart, B.P., et al. (2009). Nox4 mediates the expression of plasminogen activator inhibitor-1 via p38 MAPK pathway in cultured human endothelial cells. *Thromb Res*, 124:439–446.
- Jin, L., Beswick, R. A., Yamamoto, T. Palmer, T., Taylor, T.A., Pollock, J.S., et al. (2006). Increased reactive oxygen species contributes to kidney injury in mineralocorticoid hypertensive rats. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 57(3), 343–357.
- Johnson, D.K., Schillinger, K.J., Kwait, D.M., Hughes, C.V., Mcnamara, E.J., Ishmael, F., et al. (2002). Inhibition of NADPH oxidase activation in endothelial cells by ortho-methoxy-substituted catechols. *Endothelium*, 9,191–203.
- Jover, T., Altura, B.T., Altura, B.M. (1999). Effects of protein kinase C inhibitors on ethanol-induced contractions in isolated rat aorta. *Alcohol*;18(1):17-22.
- Kato, S., Kawase, T., Alderman, J., Inatomi, N., Lieber, C.S. (1990). Role of xanthine oxidase in ethanol-induced lipid peroxidation in rats. *Gastroenterology*, 98(1):203-10.
- Klatsky, A.L., Friedman, G.D., Siegeland, A.B., Gerard, M.J. (1977). Alcohol consumption and blood pressure. *N. Engl. J. Med.*, 296,1194-1200.
- Klatsky, A. L. (2001). Alcohol and cardiovascular diseases. In *Alcohol in Health and Disease*. Agarwal, D. P. and Seitz, H. K. eds, pp. 517–546. Marcel Dekker, New York.

- Klatsky, A.L. (2015). Alcohol and cardiovascular diseases: where do we stand today? *J Intern Med.* 278(3):238-50.
- Kleniewska, P., Michalska, M., Gorąca, A. (2013). Influence of NADPH oxidase inhibition on oxidative stress parameters in rat hearts. *Pharmacol Rep*, 65(4):898-905.
- Koch, O.R., Deleo, M.E., Borrello, S., Palombini, G., Galeotti T. (1994). Ethanol Treatment Up Regulates the Expression of Mitochondrial Manganese Superoxide Dismutase in Rat Liver. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 201(3):1356–1365.
- Koch, O., Farré, S., Leo, M., Palozza, P., Palazzotti, B., et al. (2000). Regulation of manganese superoxide dismutase (mnsod) in chronic experimental alcoholism: effects of vitamin e-supplemented and -deficient diets. *Alcohol & Alcoholism*, 35(2): 159–163.
- Kono, H., Rusyn, I., Yin, M., Gäbele, E., et al. (2000). NADPH oxidase–derived free radicals are key oxidants in alcohol-induced liver disease. *J. Clin. Invest.* 106:867–872.
- Koracevic, D., Koracevic, G., Djordjevic, V., Andrejevic, V., Cosic, V. (2001). Method for the measurement of antioxidant activity in human fluids. *J Clin Pathol*, 54:356-361.
- Kumars, S., Vasudevan, D.M. (2005). Effect of Ethanol on Liver Antioxidant Defense Systems: a Dose Dependent Study. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 20 (1):80-8.
- Ladipo, C.O., Adigun, S.A, Nwaigwe, C.I, Adegunloye, B.J. (2002). Chronic ethanol consumption alters vascular smooth muscle responses in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.*, 29(8):707-9.
- Lapperre TS, Jiménez LA, Antonicelli F, Drost EM, Hiemstra PS, Stolk J, et al. (1999). Apocynin increases glutathione synthesis and activates AP-1 in alveolar epithelial cells. *FEBS Lett.*;443(2):235-9.
- Lassègue, B., Martín, A.S., Griendling, K.K. (2012). Biochemistry, Physiology, and Pathophysiology of NADPH Oxidases in the Cardiovascular *Circ Res*;110:1364-1390.
- Laure-Achagiotis, C., Poussard, A.M., Loui-Sylvestre, J. (1990). Alcohol drinking, food and fluid intakes and body weight gain in rats. *Physiology and Behavior*, 47: 545-548.
- Lecomte, E., Herbeth, B., Pirollet, P., Chancerelle, Y., Arnaud, J., Musse, N., et al. (1994). Effect of alcohol consumption on blood antioxidant nutrients and oxidative stress indicators. *Am J Clin Nutr*; 60(2):255-61.
- Ledig, M., M'paria, J.R., Mandel, P. (1981). Superoxide dismutase activity in rat brain during acute and chronic alcohol intoxication. *Neurochem Res.* 6(4):385-90.

- Legros, E., Tirapelli C.R., Carrier E., Brochu I., Fournier A., D'orléans-Juste P. (2007). Characterization of the non-adrenergic/non-cholinergic response to perivascular nerve stimulation in the double-perfused mesenteric bed of the mouse. *Br J Pharmacol*, 152(7), 1049-59.
- Lian, C. (1915). L'alcoholisme, cause d'hypertension arterielle. *Bull. Acad. Natl. Med. (paris)*, 74, 525-28.
- Ly, P., Miao, S., Shu, Y., Dong, L., Liu, G., XIE, X., Gao, M., et al. (2012). Phosphorylation of Smooth Muscle 22 Facilitates Angiotensin II-Induced ROS Production Via Activation of the PKC-P47phox Axis Through Release of PKC and Actin Dynamics and Is Associated With Hypertrophy and Hyperplasia of Vascular Smooth Muscle Cells In Vitro and In Vivo. *Circulation Research*. 111:697-707.
- Lyle, A.N., Griendling, K.K. (2006). Modulation of vascular smooth muscle signaling by reactive oxygen species. *Physiology (Bethesda)*, 21, 269–280.
- Macieira, M.S., Almeida, W.G., Silva, E.A., Schenberg, L.C. Nakamurapalacios, E.M. (1997). Alcohol dependence induced in rats by semivoluntary intermittent intake. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 30: 1107-1111.
- Macmahon, S.W. (1987). Alcohol consumption and hypertension. *Hypertension*, 9(2), 111-21.
- Macmahon, S.W., Blacket, R.B., Macdonald, G.J., Hall, W. (1984). Obesity, alcohol consumption and blood pressure in Australian men and women. *J. Hypertens*, 2, 85-91.
- McNally, J.S., Davis, M.E., Giddens, D.P., Saha, A., Hwang, J., Dikalov, S. et al. (2003). Role of xanthine oxidoreductase and NADPH oxidase in endothelial superoxide production in response to oscillatory shear stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 285:H2290 –H2297.
- Manea, A. (2010). NADPH oxidase-derived reactive oxygen species: involvement in vascular physiology and pathology. *Cell Tissue Res*, 342:325–339.
- Marchi, K. C., Muniz, J. J., Tirapelli, C. R. (2014). Hypertension and chronic ethanol consumption: What do we know after a century of study? *World Journal of Cardiology*, 6, 283-294.
- Martínez-Revelles, S., Avendaño, M.S., García-Redondo, A.B., Alvarez, Y., Aguado, A., Pérez-Girón, J.V., García-Redondo, et al. (2013). Reciprocal relationship between reactive oxygen species and cyclooxygenase-2 and vascular dysfunction in hypertension. *Antioxid Redox Signal*. 18(1):51-65.

- Matsuza, W.A.A., Ichijo, H. (2008). Redox control of cell fate by MAP kinase: physiological roles of ASK1-MAP kinase pathway in stress signaling. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1780(11), 1325–1336.
- Matsuno, K., Yamada, H., Iwata, K., Jin, D., Katsuyama, M., Matsuki, M. et al. (2005). Nox1 is involved in angiotensin II-mediated hypertension: a study in Nox1-deficient mice. *Circulation* 112: 2677–2685.
- Mccubrey, J. A., Lahair, M. M., Franklin, R. A. (2006). Reactive oxygen species-induced activation of the MAP kinase signaling pathways. *Antioxidants and Redox Signaling*, 8(9-10), 1775–1789.
- Meister, K. A., Whelan, E. M., Kava, R. (2000). The health effects of moderate alcohol intake in humans: an epidemiologic review. *Critical Reviews in Clinical and Laboratory Sciences*, 37, 261–296.
- Meng R., Zhu, D., Bi, Y., Yang, D., Wang, Y. (2011). Anti-Oxidative Effect of Apocynin on Insulin Resistance in High-Fat Diet Mice. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 41(3).
- Miller, P.M., Anton, R.F., Egan, B.M., Basile, J., Nguyen, S.A. (2005). Excessive Alcohol Consumption and Hypertension: Clinical Implications of Current Research. *The Journal of Clinical Hypertension*, 7(6).
- Minicis, S., Brenner, D.A. (2008). Oxidative stress in alcoholic liver disease: Role of NADPH oxidase complex. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 23 Suppl. 1.
- Modlinger, P., Chabrashvili, T., Gill, P.S., Mendonca, M., Harrinson, D.G., Griendling, K.K., et al. (2006). RNA silencing in vivo reveals role of p22phox in rat angiotensin slow pressor response. *Hypertension*, 47, 238–244.
- Molina, P.E., Hoek, J.B., Nelson, S., Guidot, D.M., Lang, C.H., Wands, J.R. (2003). Mechanisms of alcohol-induced tissue injury. *Alcohol Clin Exp Res*;27(3):563-75.
- Montezano, A.C., Touyz, R.M. (2012). Reactive Oxygen Species and Endothelial Function – Role of NOS Uncoupling and Nox Family NADPH Oxidases. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*;110(1):87-94.
- Montezano, A.C., Touyz, R.M. (2012). Molecular Mechanisms of Hypertension—Reactive Oxygen Species and Antioxidants: A Basic Science Update for the Clinician. *Canadian Journal of Cardiology*, 28:288–295.
- Montezano, A.C., Cat, A.N.D., Rios, F.J., Touyz, R.M. (2014). Angiotensin II and Vascular Injury. *Curr Hypertens Rep* ,16(6):431.

- Muijsers, R.B.R., Van den Worm, E., Folkerts, G., Beukelman, C.J., Koster, A.S., Postma, D.S., et al. (2000). Apocynin inhibits peroxynitrite formation by murine macrophages. *Br. J. Pharmacol*, 130,932–936.
- Muijsers, R.B.R., Ark, I.V., Folkerts, G., Koster, A.S., Van Oosterhout, A.J.M., Postma, D.S., Nijkamp, F.P. (2001). Apocynin and 1400 W prevents airway hyperresponsiveness during allergic reactions in mice. *Br. J. Pharmacol*, 134,434–440.
- Münzel, T., Afanas'ev, I.B., Kleschyov, A.L., Harrison, D.G. (2002). Detection of superoxide in vascular tissue. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*;22(11):1761-8.
- Nakashima, H., Frank, G.D., Shirai, H., Hinoki, A., Higuchi, S., Ohtsu, H., et al. (2008). Novel Role of Protein Kinase C Delta Tyr311 Phosphorylation in Vascular Smooth Muscle Cell Hypertrophy by Angiotensin II. *Hypertension*; 51(2): 232–238.
- Nakazono, K., Watanabe, N., Matsuno, K., Sasaki, J., Sato, T., Inoue, M. (1991). Does superoxide underlie the pathogenesis of hypertension? *Proc Natl Acad Sci USA*; 88:10045–10048.
- Neves, K.B., Lobato, N.S., Lopes, R.A., Filgueira, F.P., Zanotto, C.Z., et al. (2014). Chemerin reduces vascular nitric oxide/cGMP signalling in rat aorta: a link to vascular dysfunction in obesity? *Clin Sci (Lond)*. 127(2):111-22.
- O’rourke, M., Tuma, D., Casey, C. (1997). Decreased binding and autophosphorylation of the epidermal growth factor receptor in ethanol-fed rats. *Biochem. Pharmacol*. 53, 1445–1450.
- Panieri, E., Santoro, M.M. (2015). ROS signaling and redox biology in endothelial cells. *Cell Mol Life Sci.*;72(17):3281-303.
- Parasuraman, S., Raveendran, R. (2012). Measurement of invasive blood pressure in rats. *J Pharmacol Pharmacother*. 3(2): 172–177.
- Paravicini, T.M., Touyz, R.M. (2008). NADPH oxidases, reactive oxygen species and hypertension – Clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care* 31: S170-S180.
- Park, Y.M., Park, M.Y., Suh, Y., Park, J.B. (2004). NADPH oxidase inhibitor prevents blood pressure elevation and cardiovascular hypertrophy in aldosterone-infused rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*;313:812–817.
- Park, Y., Yang, J., Zhang, H., Chen, X., Zhang, C. (2011). Effect of PAR2 in regulating TNF-alpha and NADPH oxidase in coronary arterioles in type 2 diabetic mice. *Basic Res Cardiol*,106(1), 111–123.

- Park, S.C., Lim, J., Jeon, Y.T., Keum, B., Seo, Y.S., et al. (2012). Ethanol-induced DNA damage and repair-related molecules in human intestinal epithelial Caco-2 cells. *Molecular Medicine Reports*, 5: 1027-1032.
- Passaglia, P., Ceron, C.S., Mecawi, A.S., Antunes-Rodrigues, J., Coelho, E.B., Tirapelli, C.R. (2015). Angiotensin type 1 receptormediates chronic ethanol consumption-induced hypertension and vascular oxidative stress. *Vascul. Pharmacol*; [Epub ahead of print]
- Passos, V.M.A., Assis, T.D., Barreto, S.M. (2006). Hypertension in Brazil: estimates from population-based prevalence studies. *Epidemiol. Serv. Saúde*, Brasília, 15(1).
- Pigeolet, E., Corbisier, P., Houbion, A., Lambert, D., Michiels, C., Raes, M., et al. (1990). Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals. *Mech Ageing Dev.* 15;51(3):283-97.
- Pinardi, G., Brieva, C., Vinet, R. Penna, M. (1992). Effects of chronic ethanol consumption on α -adrenergic-induced contractions in rat thoracic aorta. *Gen. Pharmacol.*, 23 (2),245-8.
- Polikandriotis, J.A., Rupnow, H.L., Elms, S.C., Clempus, R.E., Campbell, D.J., Sutliff, R.L., et al. (2006). Chronic Ethanol Ingestion Increases Superoxide Production and NADPH Oxidase Expression in the Lung. *Am J Respir Cell Mol Biol.*;34(3):314-9.
- Popolo, A., Autore, G., Pinto, A., Marzocco, S. (2013). Oxidative stress in patients with cardiovascular disease and chronic renal failure. *Free Radical Research*; 47(5): 346–356.
- Puddey, I.B., Rakic, V., Dimmitt, S.B., Beilin L.J. (1999). Influence of pattern of drinking on cardiovascular disease and cardiovascular risk factors-a review. *Addiction*, 94(5), 649–663.
- Qin, L., Crews, F.T. (2012). NADPH oxidase and reactive oxygen species contribute to alcohol-induced microglial activation and neurodegeneration *Journal of Neuroinflammation*; 9:5.
- Racz, B., Hanto, K., Tapodi, A., Solti, I., Kalman, N., Jakus, P., Kovacs, K., Debreceni, B., Gallyas, Jr F., Sumegi, B. (2010). Regulation of MKP-1 expression and MAPK activation by PARP-1 in oxidative stress: a new mechanism for the cytoplasmic effect of PARP-1 activation. *Free Radic. Biol. Med.* **49(12)**:1978-88.
- Ray, R., Murdoch, C.E., Wang, M., Santos, C.X., Zhang, M., Alom-Ruiz, S., et al. (2011). Endothelial Nox4 NADPH Oxidase Enhances Vasodilatation and Reduces Blood Pressure In Vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Bio*;31:1368-1376.
- Reddy, S.K., Husain, K., Schlorff, E.C., Scott, R.B., Somani, S.M. (1999). Dose response of ethanol ingestion on antioxidant defense system in rat brain subcellular fractions. *Neurotoxicology*;20(6):977-87.

- Rendon-Ramirez, A., Cortes-Couto, M., Martinez-Rizo, A.B., Muniz-Hernandez, S., Velazquez-Fernandez, J.B. (2013). Oxidative damage in young alcohol drinkers: A preliminary study. *Alcohol*. 47(7):501-4.
- Resstel, L.; Tirapelli, C.R.; Lanchote, V.L.; Uyemura, S.A.; De Oliveira, A.M.; Corrêa A, F. (2006). Chronic ethanol consumption alters cardiovascular functions in conscious rats. *Life Sciences*, 78(19), 2179-2187.
- Ronksley, R., Brien, S., Turner, B., Mukamal, K., Ghali, W. (2011). Association of alcohol consumption with selected cardiovascular disease outcomes: a systematic review and meta-analysis. *British Medical Journal*;342:d671.
- Rua, R.M., Ojeda, M.L., Nogales, F., Rubio, J.M., Romero-Gómez, M., Funuyet, J., et al. (2014). Serum selenium levels and oxidative balance as differential markers in hepatic damage caused by alcohol. *Life Sciences* 94: 158–163.
- Ruffels, J., Griffin, M., Dickenson, J.M. (2004). Activation of ERK1/2, JNK and PKB by hydrogen peroxide in human SH-SY5Y neuroblastoma cells: role of ERK1/2 in H₂O₂-induced cell death. *European Journal of Pharmacology* 483:163– 173.
- Russell, A., Watts, S. (2000). Vascular Reactivity of Isolated Thoracic Aorta of the C57BL/6J Mouse1. *J Pharmacol Exp Ther*. 294(2), 598-604, 2000.
- Sachinidis, A., Gouni-Berthold, I., Seul, C., Seewald, S., Ko, Y., Schmitz, U., Vetter, H. (1999). Early intracellular signalling pathway of ethanol in vascular smooth muscle cells. *Br. J. Pharmacol.*, 128(8),1761-71.
- Schisler, N.J., Singh, S.M. (1989). Effect of ethanol in vivo on enzymes oxygen free radicals which detoxify. *Free Radical Biology & Medicine*, 7, 117-123.
- Seshiah, P.N., Weber, D.S., Rocic, P., Valppu, L., Taniyama, Y., Griendling, K.K. (2002). Angiotensin II Stimulation of NADPH Oxidase Activity Upstream Mediators. *Circ Res*. 91:406-13.
- Shaper, A.G. (1993). Alcohol, the heart, and health *Am J Public Health*. 83(6): 799–801.
- Schlörff, E.C., Husain, K., Somani, S.M. (1999). Dose- and time-dependent effects of ethanol on plasma antioxidant system in rat. *Alcohol*.;17(2):97-105.
- Schramm, A., Matusik, P., Osmenda, G., Guzik, T.J. (2012). Targeting NADPH oxidases in vascular pharmacology. *Vascular Pharmacology*. 56:216–231..

Scott, R.B., Reddy, K.S., Husain, K., Somani, S.M. (1999). Time course response to ethanol of hepatic antioxidant system and cytochrome P450 II E1 in rat. *Environ. Nutr. Interac.* 3, 217-31.

Secretaria Nacional Antidrogas (SENAD, 2007). Disponível: www.obid.senad.gov.br.

Sesso, H.D., Cook, N.R., Buring J.E., Manson J.E., Gaziano, J.M. (2008). Alcohol Consumption and the Risk of Hypertension in Women and Men. *Hypertension*, 51,1080-1087.

Sirker, A., Zhang, M., Shah, A.M. (2011). NADPH oxidases in cardiovascular disease: insights from in vivo models and clinical studies. *Basic Res Cardiol*, 106,735–747.

Singh, K., Kaur, J., Ahluwalia, P., Sharma, J. (2012). Effect of monosodium glutamate on various lipid fractions and certain antioxidant enzymes in arterial tissue of chronic alcoholic adult male mice. *Toxicol Int.*,19(1):9-14.

Skliros, E.A., Papadodima, S.A., Sotiropoulos, A., Xipnitos, C., Kollias, A., Spiliopoulou, C.A. (2012). Relationship Between Alcohol Consumption and Control of Hypertension Among Elderly Greeks. The Nemea Primary Care Study. *Hellenic J Cardiol.*,53,26-32.

Son, Y., Cheong, Y., Kim, N., Chung, H., Kang, D.G., Pae, H.O. (2011). Mitogen-Activated Protein Kinases and Reactive Oxygen Species: How Can ROS Activate MAPK Pathways? *Journal of Signal Transduction*.

Stańczyk, M., Gromadzińska, J., Wąsowicz, W. (2005). The Effect of Vitamin C and Glutathione on Ethanol Cytotoxicity and Selected Parameters of Pro- and Antioxidative Processes in Mouse Fibroblasts 3T3-L1. *Polish Journal of Environmental Studies*, 15(1),131-137.

Stewart, C.W., Kennedy, R.H. (1999). Effects of chronic ethanol consumption on aortic constriction in male and female rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 366,55-60.

Stolk, J., Hiltermann, T.J., Dijkman, J.H., Verhoeven, A.J. (1994). Characteristics of the inhibition of NADPH oxidase activation in neutrophils by apocynin, a methoxy-substituted catechol. *Am J Respir Cell Mol Biol.*, 11,95–102.

Sun, H., Mayan, W.G. (2001). Temporal effect of alcohol consumption on reactivity of pial arterioles: role of oxygen radicals. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 280(3), H992-H1001.

Sun, H., Molacek, E., Zheng, H., Fang, Q., Patel, K.P., Mayhan, W.G. (2006). Alcohol-induced impairment of neuronal nitric oxide synthase (nNOS)-dependent dilation of cerebral arterioles: role of NADPH oxidase. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*; 40: 321–328.

Tajima, M., Kurashima, Y., Sugiyama, K., Ogura, T., Sakagami, H. (2009). The redox state of glutathione regulates the hypoxic induction of HIF-1. *Eur J Pharmacol*; 606: 45–49.

Takac, I., Schröder, K., Brandes, R.P.(2012). The Nox Family of NADPH Oxidases: Friend or Foe of the Vascular System? *Curr Hypertens Rep*;14:70–78.

Thakur, V., Pritchard, M.T., McMullen, M.R., Wang, Q., Nagy, L.E. (2006). Chronic ethanol feeding increases activation of NADPH oxidase by lipopolysaccharide in rat Kupffer cells: role of increased reactive oxygen in LPS-stimulated ERK1/2 activation and TNF- α production *Journal of Leukocyte Biology*, 79.

Thannickal, V. J., Fanburg, L. (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *American Journal of Physiology*, 279(6),L1005–L1028.

Thomas, S.R., K. Chen, J.F. Keaney, JR. (2003). Oxidative stress and endothelial nitric oxide bioactivity. *Antioxid Redox Signal*. 5(2):181-94.

Tirapelli, C.R., Al-Khoury, J., Bkaily, G., D’orleans-Juste, P., Lanchote, V.L., Uyemura, S.A., et al. (2006A). Chronic ethanol consumption enhances phenylephrine-induced contraction in the isolated rat aorta. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 316, 233-41.

Tirapelli, C.R., Casolari, D.A., Montezano, A.C., Yogi, A., Tostes, R.C., Legros, E., et al. (2006b). Ethanol consumption enhances endothelin-1-induced contraction in the isolated rat carotid. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 318(2),819-27.

Tirapelli, C.R., Leone, A.F., Yogi, A., Tostes, R.C., Lanchote, V.L., Uyemura, S.A., et al. (2008). Ethanol consumption increases blood pressure and alters the responsiveness of the mesenteric vasculature in rats. *J. Pharm. Pharmacol.*, 60(3), 331-41.

Tirapelli CR, Fukada SY, Yogi A, Chignalia AZ, Tostes RC, Bonaventura D, et al. (2008). Gender-specific vascular effects elicited by chronic ethanol consumption in rats: a role for inducible nitric oxide synthase. *Br J Pharmacol*, 153:468-479.

Toda, N., Ayajikib, K. (2010). Vascular Actions of Nitric Oxide as Affected by Exposure to Alcohol. *Alcohol and Alcoholism*, 45(4): 347-355.

Touyz, R.M., Briones, A.M. (2011). Reactive oxygen species and vascular biology: implications in human hypertension. *Hypertension Research*, 34, 5–14.

Touyz, R.M., Mercure, C., He, Y., Javeshghani, D., Yao, G., Callera, G.E., et al. (2005). Angiotensin II-dependent chronic hypertension and cardiac hypertrophy are unaffected by gp91phox-containing NADPH oxidase. *Hypertension*, 45, 530–537.

Touyz, R.M., Schiffrin, E.L. (2000). Signal Transduction Mechanisms Mediating the Physiological and Pathophysiological Actions of Angiotensin II in Vascular Smooth Muscle Cells. *Pharmacol. Rev.*, 52(4),639-72.

- Touyz, R.M., Yao, G., Schiffrin, E.L. (2003). c-Src Induces Phosphorylation and Translocation of p47phox: Role in Superoxide Generation by Angiotensin II in Human Vascular Smooth Muscle Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23:981-987.
- Touyz, R.M., Montezano, A.C. (2012). Vascular Nox4, A Multifarious NADPH Oxidase. *Circulation Research.* 110:1159-1161.
- Touyz, R.M. (2005). Intracellular mechanisms involved in vascular remodelling of resistance arteries in hypertension: role of angiotensin II. *Exp. Physiol.* **90(4)**:449-455.
- Unger, B.S., Patil, B.M. (2009). Apocynin improves endothelial function and prevents the development of hypertension in fructose fed rat. *Indian J. Pharmacol.*, 41,208–212.
- Utkan, T., Yildiz, F., Ilbay, G., Ozdemirci, S., Erden, B. F., Gacar, N. (2001). Blood pressure and vascular reactivity to endothelin- 1, phenylephrine, serotonin and acetylcholine following chronic alcohol consumption in vitro. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 15: 157–165.
- Urso, T., Gavalier, J.S., Van Thiel, D.H. (1981). Blood ethanol levels in sober alcohol users seen in an emergency room. *Life Sci*, 28: 1053-56.
- Virdis, A., Duranti, E., Taddei, S. (2011). Oxidative Stress and Vascular Damage in Hypertension: Role of Angiotensin II. *International Journal of Hypertension.*
- Virdis, A., Neves, M.F., Amiri, F., Touyz, R.M., Schiffrin, E.L. (2004). Role of NADPH oxidase on vascular alterations in angiotensin II-infused mice. *J Hypertens.* 22(3):535-42.
- Vigitel Brasil 2012 : vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico /Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos não Transmissíveis e Promoção de Saúde. – Brasília : Ministério da Saúde, 2013.136 p.: il.
- Vucevic, D., Mladenovic, D., Ninkovic, M., Stankovic, M.N., Jorgacevic, B., Stankovic, M.S., et al. (2013). Influence of aging on ethanol-induced oxidative stress in digestive tract of rats. *Hum Exp Toxicol*, 32: 698.
- Xiao, J., Wang, J., Xing, F., Han, T., Jiao, R., et al. (2014). Zeaxanthin Dipalmitate Therapeutically Improves Hepatic Functions in an Alcoholic Fatty Liver Disease Model through Modulating MAPK Pathway. *PLoS ONE*, 9(4): e95214.
- Zalba, G., José, G.S., Moreno, U.M., Fortuño, M.A., Fortuño, A., Beaumont, F.J., Díez, J. (2001). Oxidative Stress in Arterial Hypertension : Role of NADPH Oxidase. *Hypertension*, 38:1395-1399.

- Zakhari S. (2006). Overview: how is alcohol metabolized by the body? *Alcohol Res Health*;29(4):245-54.
- Yagi, K. (1998). Simple assay for the level of total lipid peroxides in serum or plasma. *Methods Mol Biol*;108:101-6.
- Yang, Z.W., Wang, J., Zheng, T., Altura, B.T., Altura, B.M. (2001a). Importance of PKC and PI3Ks in ethanol-induced contraction of cerebral arterial smooth muscle. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 280(5),2144-52.
- Yang, Z.W., Wang, J., Zheng, T., Altura, B.T., Altura, B.M. (2001b). Ethanol-induced contractions in cerebral arteries: role of tyrosine and mitogen-activated protein kinases. *Stroke*, 32(1),249-57.
- Yang, Z.W., Wang, J., Zheng, T., Altura, B.T., Altura, B.M. (2002). Roles of tyrosine kinase-, 1-phosphatidylinositol 3-kinase-, and mitogen-activated protein kinase-signaling pathways in ethanol-induced contractions of rat aortic smooth muscle: possible relation to alcohol-induced hypertension. *Alcohol*, 28(1),17-28.
- Yang, Y., Huang, A., Kaley, G., Sun, D. (2009). eNOS uncoupling and endothelial dysfunction in aged vessels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 297(5): H1829–H1836.
- Yeligar, S.M., Harris, F.L., Hart, C.M., Brown, L.A.S. (2012). Ethanol Induces Oxidative Stress in Alveolar Macrophages via Upregulation of NADPH Oxidases. *The Journal of Immunology*.
- Yogi, A., Callera, G.E., Mecawi, A.S., Batalhão, M.E., Carnio, E.C., Rodrigues, J.A., et al. (2012). 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.* 1;264(3):470-8.
- Young, I.S. (2001). Measurement of total antioxidant capacity. *J Clin Pathol* ;54:339.
- Yoshita, K., Miura, K., Morikawa, Y., Ishizaki, M., Kido, T., Naruse, Y., et al. (2005). Relationship of alcohol consumption to 7-year blood pressure change in Japanese men. *J Hypertens.*, 23(8),1485-90.
- Wang, H.D., Xu, S., Johns, D.G., Du, Y., Quinn, M.T., Cayatte, A.J., Cohen, R.A. (2001). Role of NADPH oxidase in the vascular hypertrophic and oxidative stress response to angiotensin II in mice. *Circ Res*, 88,947–953.
- Wang, Q., Smith, R.E., Luchtefeld, R., Sun A.Y., Simonyi A., Luo, R., Sun,G.Y. (2008). Bioavailability of apocynin through its conversion to glycoconjugate but not to diapocynin. *Phytomedicine*,15(6-7)496–503.

- Wang X, Ke Z, Chen G, Xu M, Bower KA, et al. (2012). Cdc42-Dependent Activation of NADPH Oxidase Is Involved in Ethanol-Induced Neuronal Oxidative Stress. *PLoS ONE*. 7(5): e38075.
- Wagner, M.C., Yeligar, S.M., Brown, L.A., Hart, C.M. (2012). PPAR γ ligands regulate NADPH oxidase, eNOS, and barrier function in the lung following chronic alcohol ingestion. *Alcohol Clin Exp Res*, 36:197-206.
- Wannamethee, G. & Shaper, A. G. (1991). Alcohol intake and variations in blood pressure by day of examination, *Journal of Human Hypertension*, 5, 59- 67.
- Washington, B., Mtshali, C., Williams, S., Smith, H., Li, J.D., Shaw, B., et al. (2003). Ethanol-induced mitogen activated protein kinase activity mediated through protein kinase C. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*; 49(8):1351-6..
- Wingler, K., Hermans, J.J.R., Schiffrers, P., Moens, A.L., Paul, M., Schmidt, H.H.H.W. (2011). NOX1, 2, 4, 5: counting out oxidative stress. *British Journal of Pharmacology* 164(3), 866–883.
- Wind, S., Beuerlein, K., Armitage, M.E., Taye, A., Kumar, A.H.S., Janowitz, D., et al. (2010). Hypertensive Rats by NOX1/2 Is Reversed by NADPH Oxidase Inhibition Oxidative Stress and Endothelial Dysfunction in Aortas of Aged Spontaneously. *Hypertension*. 56:490-497.
- World Health Day 2013: measure your blood pressure, reduce your risk. Geneva, World Health Organization, 2013.
- I Levantamento Nacional sobre os padrões de consumo de álcool na população brasileira / Elaboração, redação e organização: Ronaldo Laranjeira [et al.]; Revisão técnica científica: Paulina do Carmo Arruda Vieira Duarte. Brasília : Secretaria Nacional Antidrogas, 2007
- VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. Arq. Bras. Cardiol., São Paulo, v. 95, n. 1, 2010. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=>. access on 30 Jan. 2012.