

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**“Estudo da participação da angiotensina II nas disfunções cardiovasculares
induzidas pelo consumo crônico de etanol”**

Patrícia Passaglia

Ribeirão Preto

2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**“Estudo da participação da angiotensina II nas disfunções cardiovasculares
induzidas pelo consumo crônico de etanol”**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia
para obtenção do Título de Mestre em
Ciências

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientada: Patrícia Passaglia

Orientador: Prof. Dr. Carlos Renato Tirapelli

Ribeirão Preto

2014

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Patrícia Passaglia

Estudo da participação da angiotensina II nas disfunções cardiovasculares induzidas pelo consumo crônico de etanol. Ribeirão Preto, 2014.

140 p. : il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.

Orientador: Tirapelli, Carlos Renato.

1. Angiotensina II.
2. Etanol
3. Alterações miogênicas.
4. Alterações neurohumorais

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Patrícia Passaglia

Título do trabalho: “Estudo da participação da angiotensina II nas disfunções cardiovasculares induzidas pelo consumo crônico de etanol”

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Renato Tirapelli

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

À Deus, minha família, amigos, colegas de trabalho e orientador pelo apoio, força, incentivo, companheirismo e amizade. Sem eles nada disso seria possível.

Dedicatória

À Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar os caminhos nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.

Ao meu orientador Carlos Renato Tirapelli pela oportunidade a mim concedida, pelo apoio, pela confiança e por contribuir para o meu crescimento pessoal e profissional.

Ao querido professor doutor Eduardo Barbosa Coelho, pela gentileza que sempre lhe foi peculiar. Sem sua ajuda e compreensão este trabalho não poderia ser executado.

Aos meus pais Martha e Osvaldo, por seus gestos solidários, pelo amor e carinho que soube me proteger e me ensinar os limites da vida, por ter investido e acreditado sempre na educação e me incentivado a trilhar os caminhos do conhecimento capaz de transformar as pessoas sempre para melhor. Obrigada por me ensinarem a não desistir dos meus sonhos, por acreditar em mim e por compartilhar de muitas das minhas angústias e conquistas.

Às minhas irmãs Jaqueline e Vanessa pelo amor, apoio, confiança e motivação incondicional. Que sempre me impulsiona em direção às vitórias dos meus desafios. Obrigada também aos meus cunhados Leonardo e Júnior pelo apoio de sempre.

À toda minha família, a qual amo muito, pelo carinho, paciência e incentivo.

Ao Felipe, meu amor. Obrigada pela sua força, por sua dedicação, pela espera paciente nos momentos de ausência, por toda a sua capacidade de compreensão, por sua confiança em mim, enfim, pela sua presença em minha vida. Pelo amor que me mostrou a direção correta e me ensinou a ter fé na vida.

Agradecimentos

As minhas amigas Carol e Pet que fizeram parte desses momentos sempre me ajudando e incentivando. Pelo amor, apoio, confiança e motivação. Que sempre me impulsiona em direção às vitórias dos meus desafios.

Aos meus amigos queridos e especiais Jana, Lets, Paulinho, Juliana e Ulisses que sempre estiveram do meu lado dando força e apoio. A amizade e o carinho de vocês foram fundamentais para a realização deste trabalho e em vários momentos de minha vida. Obrigada pelos incentivos na parte experimental seja durante o dia ou noite, com chuva, neblina ou sol, dia de semana ou feriado, por acreditar que tudo daria certo no final.

As minhas colegas de laboratório Ana, Kátia, Jóice, Naty e Gaby que participaram diretamente deste trabalho e me ajudaram em tantos os momentos.

Ao Marcelo, Angelita e Dú, amigos especiais que me ajudaram a nunca desistir de um sonho, pelo apoio, carinho, respeito e pelos ensinamentos.

Ao André e a Milene, muito obrigada pela ajuda, ensinamentos, orientações e contribuições. Por me receber em seu laboratório de portas abertas. Vocês foram partes fundamentais na realização deste trabalho.

A Dra Evelin Cappelari Cárnio da EERP-USP pelo apoio e colaboração na utilização dos equipamentos de seu laboratório e pelo carinho e generosidade sempre.

A Dra Cláudia Maria Padovan da FFCL-USP pelo apoio e colaboração na utilização do laboratório e biotério.

Agradecimentos

Ao Dr José Antunes Rodrigues da FMRP-USP pelo apoio e colaboração na utilização dos aparelhos e técnicas de dosagens hormonais.

Ao Dr Bruno Spinosa de Martinis da FCFRP-USP colaboração na utilização dos aparelhos e técnicas de dosagens hormonais.

Aos professores da banca de qualificação, Dr^a. Rita de Cássia Aleixo Tostes Passaglia e Dr^a. Regina Helena Costa Queiroz, agradeço as suas preciosas considerações ao presente trabalho e generosas sugestões de aprimoramento.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica, Farmacologia e Toxicologia da USP/RP, por partilharem seus conhecimentos.

À Rose, secretária do Programa de Pós-Graduação em Toxicologia da FCFRP – USP, por sua delicadeza e sua disposição indefectível em ajudar... Em administrar as inúmeras questões burocráticas e informativas.

À FAPESP (Processo n^o.: 2012/10096-2), pelo incentivo, suporte financeiro e por acreditar no potencial desse estudo.

Agradecimentos

Não incites a beber aquele que ama o vinho, pois o vinho perdeu a muitos.

O fogo põe à prova a dureza do ferro: assim o vinho, bebido em excesso, revela o coração dos orgulhosos.

O vinho bebido sobriamente é como vida para os homens.

Que é a vida do homem a quem falta o vinho?

Que coisa tira a vida? A morte.

No princípio, foi criado para a alegria e não para a embriaguez.

O vinho, bebido moderadamente, é a alegria da alma e do coração.

A sobriedade no beber é a saúde da alma e do corpo.

O excesso na bebida causa irritação, cólera e numerosas catástrofes.

O vinho bebido em demasia é a aflição da alma.

A embriaguez inspira a ousadia e faz pecar o insensato; abafa as forças e causa feridas.

Eclesiástico 31, 30-40.

RESUMO

PASSAGLIA, P. **Estudo da participação da angiotensina II nas disfunções cardiovasculares induzidas pelo consumo crônico de etanol.** 2014. 140f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

A disfunção cardiovascular induzida pelo consumo crônico de etanol esta associada à formação de espécies reativas de oxigênio (ERO). A angiotensina II, via receptores AT₁, é um importante formador de ERO no sistema cardiovascular. O objetivo foi avaliar a participação dos receptores AT₁ nas disfunções cardiovasculares induzidas pelo consumo crônico de etanol. Ratos *Wistar* foram divididos em quatro grupos: Controle: recebeu água “*ad libitum*”; Etanol: recebeu solução de etanol 20% (vol./vol.); Controle+Losartan: recebeu água “*ad libitum*” e losartan (10 mg/kg) diariamente por gavagem; Etanol+Losartan: recebeu solução de etanol 20% e losartan. Foram realizadas aferições semanais da pressão arterial e frequência cardíaca dos animais. Foram realizadas as dosagens para determinar: o nível de etanol no sangue; os níveis plasmáticos e teciduais (aorta e leito arterial mesentérico) de angiotensina I (ANG I) e ANG II; a atividade plasmática da renina; atividade plasmática e tecidual da enzima conversora de angiotensina (ECA); níveis plasmáticos de aldosterona; níveis plasmáticos do peptídeo natriurético atrial (ANP), vasopressina (AVP) e ocitocina (OT); a osmolaridade e o sódio plasmático; nitrato plasmático e tecidual; espécies reativas ao ácido tiobarbitúico (TBARS); a formação tecidual de ânion superóxido; a capacidade antioxidante total; além de verificar a expressão gênica e protéica (aorta) da via das MAPKs, via do óxido nítrico (NO), das ciclooxigenases (COX), além dos componentes do sistema renina angiotensina (SRA). A artéria aorta torácica foi isolada e foram obtidas curvas concentração-resposta para fenilefrina, acetilcolina (Ach) e nitroprussiato de sódio (NPS). O tratamento crônico de etanol aumentou a pressão arterial sistólica, diastólica e média dos animais, sem afetar a frequência cardíaca; induziu o aumento da atividade plasmática da renina, aumento da atividade da ECA e dos níveis plasmáticos de ANG I e ANG II, sendo que tais efeitos não foram prevenidos pela administração de losartan. Não houve alteração dos níveis teciduais de ANG I e ANG II. O tratamento com etanol não alterou a osmolaridade ou os níveis plasmáticos de sódio e de aldosterona. Nos animais tratados cronicamente com etanol houve redução plasmática de AVP, OT e aumento de ANP. O losartan não preveniu estes efeitos induzidos pelo etanol. O etanol promoveu aumento dos níveis plasmáticos de TBARS, os níveis teciduais de ânion superóxido, e o tratamento com losartan preveniu tais respostas. O tratamento com etanol não alterou os níveis plasmáticos de peróxido de hidrogênio e da atividade plasmática da SOD. Houve redução dos níveis plasmáticos e teciduais do NO, alteração da capacidade antioxidante plasmática total e o tratamento com losartan preveniu esses efeitos. O consumo etanol potencializou a resposta vasoconstritora induzida pela fenilefrina em anéis de aorta com e sem endotélio. O losartan preveniu tal resposta contrátil. No entanto, o tratamento com etanol não alterou a resposta de relaxamento induzida pela Ach e pelo NPS em anéis de aorta. O etanol foi capaz de alterar a expressão gênica e protéica da via das MAPKs, via do NO-AKT, das COX, e os componentes do SRA. Portanto, conclui-se que o consumo crônico de etanol ativa o SRA sistêmico, induz estresse oxidativo sistêmico e vascular, altera a reatividade vascular, reduz os níveis plasmáticos de NO, altera a expressão gênica e protéica da via das MAPKs, do NO, das COX e os componentes do SRA, e promove alterações neuro-humorais que, em conjunto, contribuem para a elevação da pressão arterial sistêmica e alterações cardiovasculares pela ação da ANG II via receptor AT₁.

Palavras-chave: angiotensina II, etanol, estresse oxidativo, alterações miogênicas, alterações neurohumorais.

ABSTRACT

PASSAGLIA, P. **Study of participation of angiotensin II in cardiovascular dysfunction induced by chronic ethanol consumption.** 2014. 140f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

The cardiovascular dysfunction induced by chronic ethanol consumption is associated with the formation of reactive oxygen species (ROS). Angiotensin II via AT₁ receptors is a major maker of ROS in the cardiovascular system. To evaluate the role of AT₁ receptors in the cardiovascular dysfunction induced by chronic ethanol consumption. Male *Wistar* rats were divided into four groups: Control: received water "ad libitum"; Ethanol: received ethanol solution 20% (vol./vol.); Control+Losartan: received water "ad libitum" and losartan (10 mg/kg) daily by gavage; Losartan+Ethanol: received 20% ethanol solution and losartan. The measurements were performed to determine: the level of ethanol in blood, plasma and tissue levels (aorta and mesenteric arterial bed) of angiotensin I (ANG I) to ANG II, plasma renin activity, plasma and tissue activity of angiotensin converting enzyme (ACE), plasma aldosterone levels, plasma levels of atrial natriuretic peptide (ANP), vasopressin (AVP) and oxytocin (OT); osmolality and sodium, plasma and tissue nitrate (NO); tiobarbitúico reactive to acid species (TBARS); tissue formation superoxide anion, total antioxidant capacity, besides verifying the gene and protein expression of MAPK pathway, the nitric oxide (NO), the cyclooxygenase (COX), in addition to the components of the renin angiotensin (RAS). The thoracic aorta was isolated and concentration-response curves for phenylephrine, acetylcholine and sodium nitroprusside were obtained. Chronic ethanol treatment increased systolic blood pressure, diastolic and mean animals, without affecting heart rate; induced increase in plasma renin activity, increased plasma and tissue levels of ACE and plasma levels of ANG I and ANG II, and these effects were prevented by administration of losartan. There were no changes in tissue levels of ANG I and ANG II. The treatment with ethanol did not alter osmolarity and plasma levels of sodium and aldosterone. In animals chronically treated with ethanol was reduced plasma AVP, OT and ANP increase. Losartan did not prevent these effects induced by ethanol. Ethanol promoted increased plasma levels of TBARS, tissue levels of superoxide anion, and treatment with losartan prevented these responses. The ethanol treatment did not alter plasma levels of hydrogen peroxide and plasma activity of SOD. There was a reduction in plasma and tissue levels of NO, alteration in total plasma antioxidant capacity and treatment with losartan prevented these effects. The consumption ethanol potentiated the pressor response induced by phenylephrine in aortic rings with and without endothelium. The losartan prevented this contractile response. However, treatment with ethanol did not alter the response of relaxation induced by Ach and SNP in aortic rings. The ethanol was able to alter the gene and protein expression via the MAPK, via the NO-AKT, the COX, and the components of the RAS. Therefore, it is concluded that chronic consumption of ethanol activates the systemic RAS, induces systemic oxidative stress and vascular change vascular reactivity, reduces plasma levels of NO, alters gene and protein expression via the MAPK, NO, the COX and RAS components, and promotes neurohumoral changes that, together, contribute to the elevation of blood pressure and cardiovascular changes by the action of ANG II via AT₁ receptor.

Keywords: angiotensin II, ethanol, oxidative stress, alterations myogenic, neurohumoral alterations.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema do tratamento crônico com etanol.....	17
Figura 2. Efeito do consumo crônico de etanol sobre a evolução temporal do peso dos animais.....	30
Figura 3. Efeito do consumo crônico de etanol sobre a evolução temporal do consumo de ração pelos animais.....	31
Figura 4. Efeito do consumo crônico de etanol sobre a evolução temporal da ingestão de líquido pelos animais.....	32
Figura 5. Avaliação dos níveis sanguíneos de etanol no modelo experimental de consumo crônico de etanol.....	32
Figura 6. Efeito do consumo crônico de etanol sobre os valores de pressão arterial e frequência cardíaca dos animais.....	33
Figura 7. Efeito do consumo crônico de etanol sobre a atividade plasmática da renina em ratos.....	34
Figura 8. Efeito do consumo crônico de etanol sobre os níveis plasmáticos de ANG I e ANG II em ratos.....	35
Figura 9. Efeito do consumo crônico de etanol sobre os níveis de ANG I e ANG II em aorta e leito arterial mesentérico de ratos.....	35
Figura 10. Efeito do consumo crônico de etanol sobre a atividade plasmática e tecidual da ECA em ratos.....	36
Figura 11. Efeito do consumo crônico de etanol sobre os níveis plasmáticos de aldosterona em ratos.....	37
Figura 12. Efeito do consumo crônico de etanol sobre a osmolaridade e os níveis de sódio plasmático em ratos.....	38

Figura 13. Efeito do consumo crônico de etanol sob os níveis plasmáticos de ANP, AVP e OT.....	39
Figura 14. Efeito do consumo crônico de etanol sob os níveis plasmáticos de Corticosterona.....	40
Figura 15. Efeito do consumo crônico de etanol sobre os níveis das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no plasma de ratos.....	40
Figura 16. Produção de O₂⁻ derivado da NAD(P)H oxidase em aorta (A) e leito arterial mesentérico (B) de ratos.....	41
Figura 17. Efeito do consumo crônico de etanol sobre a atividade da SOD no plasma de ratos.....	42
Figura 18. Efeito do consumo crônico de etanol sobre os níveis de H₂O₂ no plasma de ratos.....	42
Figura 19. Efeito do consumo crônico de etanol sobre a atividade antioxidante no plasma de ratos.....	43
Figura 20. Efeito do consumo crônico de etanol sobre os níveis de Nitrato plasmático e tecidual de ratos.....	44
Figura 21. Efeito do consumo crônico de etanol no relaxamento induzido pela acetilcolina em anéis de artéria aorta torácica de ratos.....	45
Figura 22. Efeito do consumo crônico de etanol no relaxamento induzido pelo NPS em anéis de artéria aorta torácica de ratos.....	46
Figura 23. Efeito do consumo crônico de etanol na contração induzida pela fenilefrina em anéis de aorta com e sem endotélio.....	47
Figura 24. Efeito do consumo crônico de etanol sobre a expressão gênica da MAPK p38 de ratos.....	48
Figura 25. Efeito do consumo crônico de etanol sobre a expressão gênica da JNK/SAPK de ratos.....	48

Figura 26. Efeito do consumo crônico de etanol sobre a expressão gênica da MAPK ERK 1/2 de ratos.....	49
Figura 27. Efeito do consumo crônico de etanol sobre a expressão gênica do receptor AT₁ de ratos.....	50
Figura 28. Efeito do consumo crônico de etanol sobre a expressão gênica do receptor AT₂ de ratos.....	50
Figura 29. Efeito do consumo crônico de etanol sobre a expressão gênica da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) de ratos.....	51
Figura 30. Efeito do consumo crônico de etanol sobre a expressão gênica da nNOS de ratos.....	51
Figura 31. Efeito do consumo crônico de etanol sobre a expressão gênica da iNOS de ratos.....	52
Figura 32. Efeito do consumo crônico de etanol sobre a expressão gênica da eNOS de ratos.....	53
Figura 33. Efeito do consumo crônico de etanol sobre a expressão gênica da AKT de ratos.....	53
Figura 34. Efeito do consumo crônico de etanol sobre a expressão gênica da COX1 e COX2 de ratos.....	54
Figura 35. Efeito do consumo crônico de etanol sobre a expressão protéica da p38 MAPK total de ratos.....	55
Figura 36. Efeito do consumo crônico de etanol sobre a expressão protéica p38 MAPK fosforilada (Thr¹⁸⁰/Tyr¹⁸²) de ratos.	56
Figura 37. Efeito do consumo crônico de etanol sobre a expressão protéica JNK/SAPK total e fosforilada (Thr¹⁸³/Tyr¹⁸⁵) de ratos.	57
Figura 38. Efeito do consumo crônico de etanol sobre a expressão protéica ERK 1/2 total de ratos.....	58

Figura 39. Efeito do consumo crônico de etanol sobre a expressão protéica ERK 1/2 fosforilada (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴) de ratos.	59
Figura 40. Efeito do consumo crônico de etanol sobre a expressão protéica do receptor AT₂ de ratos.	59
Figura 41. Efeito do consumo crônico de etanol sobre a expressão protéica da ECA de ratos.....	60
Figura 42. Efeito do consumo crônico de etanol sobre a expressão protéica das isoformas da NOS.....	61
Figura 43. Efeito do consumo crônico de etanol sobre a expressão protéica da AKT total e fosforilada.....	62
Figura 44. Efeito do consumo crônico de etanol sobre a expressão protéica das isoformas da ciclooxigenase, COX1 e COX2.	63
Figura 45. Efeito do consumo crônico de etanol sobre a expressão protéica da NOX1.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Relação das sondas utilizadas na técnica de RT-PCR.....	26
Tabela 2 – Relação dos anticorpos utilizados na técnica de Imunoblot.....	27
Tabela 3 - Efeito do consumo de etanol sobre os valores de E_{max} (% relaxamento) e pD_2 da acetilcolina em anéis de aorta com endotélio.....	45
Tabela 4 - Efeito da angiotensina II sobre os valores de E_{max} (% relaxamento) e pD_2 da Nitroprussiato de Sódio em anéis de aorta com endotélio de ratos tratados cronicamente com etanol.....	46
Tabela 5 - Efeito da angiotensina II sobre os valores de E_{max} (g) e pD_2 da fenilefrina em anéis de aorta com ou sem endotélio de ratos tratados cronicamente com etanol.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ach	Acetilcolina
ACTH	Hormônio adenocorticotrópico
AKT	Proteína quinase B
AMP _c	Adenosina monofosfato cíclico
ANG I	Angiotensina I
ANG II	Angiotensina II
ANP	Peptídeo Natriurético Atrial
ANOVA	Análise de Variância
AT ₁	Receptor tipo 1 da angiotensina II
AT ₂	Receptor tipo 2 da angiotensina II
AVP	Arginina vasopressina
Bay 10-6734	Antagonista do receptor AT ₁
BH ₄	Tetrahidrobiopterina
b.p.m.	Batimentos por minuto
BSA	Albumina bovina
Ca ⁺²	Cálcio
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
Cl ⁻	Cloreto
COX	Ciclooxigenase
COX1	Ciclooxigenase 1

COX2	Ciclooxigenase 2
CRH	Hormônio liberador de corticotropina
Ct	<i>Threshold cycle</i>
DAG	Diacilglicerol
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EC ₅₀	Logaritmo negativo da concentração molar do agonista que promove 50% do efeito máximo
ECA	Enzima conversora de angiotensina
EDRF	<i>Endothelium-derived relaxing factors</i>
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetracético
EGTA	Ácido etileno-glicol-tetracético
E _{max}	Efeito máximo
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
E.P.M.	Erro padrão da média
ERK1/2	<i>Extracellular signal-regulated kinases 1 and 2</i>
ERO	Espécie reativa de oxigênio
<i>et al.</i>	Colaboradores
ET _B	Receptor tipo b da endotelina
Fig.	Figura
g	Gramma
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GABA _b	Receptor ionotrópico do ácido γ -aminobutírico
GaPdh	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>

gp91phox	NAD(P)H protótipo ou NOX2
GMPc	Guanosina monofosfato cíclico
H ⁺	Próton
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
hr.	Hora
Imunoblot	<i>Western Immunoblotting</i>
iNOS	Óxido nítrico induzível
i.p.	Intraperitonal
IP ₃	Trifosfato de inositol
IRL1620	Agonista seletivo dos receptores ET _B
JNK/SAPK	<i>C-jun N-terminal kinase</i>
K ₂ HPO ₄	Fosfato de Potássio Dibásico Anidro
Kg	Quilograma
kDa	Quilodalton
L	Litro
LEC	Líquido extracelular
log	Logaritmo
LY-294002	Inibidor da PI3K
M	Molar
MAPKs	<i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i>
MAPKK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinases kinase</i>

MAPKp38	<i>Mitogen-Activated Protein Kinases p38</i>
MEK 1/MEK 2	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i>
MDA	Malondialdeído
mEq	Miliequivalente
mg	Miligrama
mL	Mililitro
min.	Minuto(s)
mmHg	Milímetros de mercúrio
mmol	Milimol
mOsm	Miliosmol
mM	Milimolar
n	Número de animais
Na ⁺	Sódio
NaCl	Cloreto de Sódio
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NAD(P)H oxidase	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase
ng	Nanograma
nm	Comprimento de onda de emissão
nmol	Nanomol
nNOS	Óxido nítrico neural
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase

Nox	Nitrato/nitrito
NOXA1	<i>NADPH oxidase activator 1</i>
NOX1	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase 1
NPS	Nitroprussiato de Sódio
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
ONOO ⁻	Peroxinitrito
OT	Ocitocina
p22phox	Unidade catalítica da NAD(P)H oxidase
p40phox	Unidade catalítica da NAD(P)H oxidase
p47phox	Unidade catalítica da NAD(P)H oxidase
p67phox	Unidade catalítica da NAD(P)H oxidase
PA	Pressão arterial
PAD	Pressão arterial diastólica
pAKT	AKT na forma fosforilada
PAM	Pressão arterial média
PAS	Pressão arterial sistólica
PBS	Tampão fosfato em salina 0,15 M
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pD ₂	Logarítmo negativo da EC ₅₀
PD-98059	Antagonista seletivo da MAPKK
pERK 1/2	<i>Extracellular regulated kinase</i> na forma fosforilada
pg	Picograma

pH	Potencial hidrogeniônico
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
pJNK/SAPK	<i>C-jun N-terminal kinase</i> na forma fosforilada
PKC	Proteína quinase C
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
PLC	Fosfolipase C
PLD	Fosfolipase D
pMAPKp38	MAPKp38 na forma fosforilada
pmol	Picomole
PVN	Núcleo paraventricular
Rac	Subfamília da família Rho de GTPases
RNA	Ácido ribonucléico
RNAm	Ácido ribonucléico mensageiro
r.p.m.	Rotações por minuto
RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real
SB-203580	Inibidor da MAPKp38
SDS	Dodecil sulfato de sódio
Ser ⁴⁷³	Resíduo de fosforilação da AKT
SEM	Desvio padrão da média
Src	Família das tirosinas quinases não ligadas a receptores
SOD	Superóxido dismutase
SON	Núcleo supra-óptico

SNC	Sistema Nervoso Central
SRA	Sistema renina angiotensina
TBARS	Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
TBD-T	Tampão tris salina
Thr ²⁰² /Tyr ²⁰⁴	Resíduo de fosforilação da ERK1/2
Thr ¹⁸⁰ /Tyr ¹⁸²	Resíduo de fosforilação da MAPKp38
TRIS	Tris ácido
TXA ₂	Tromboxano A ₂
U	Unidade
U0126	Antagonista seletivo da MEK 1/MEK 2
URF	Unidades Relativas de Fluorescência
V	Volt
VSMC	Célula muscular lisa
V1 _a	Receptor tipo 1a de vasopressina
V1 _b	Receptor tipo 1b de vasopressina
V2	Receptor tipo 2 de vasopressina
[Ca ²⁺] _i	Concentração intracelular de Cálcio
v/v ou vol./vol.	Unidade de concentração volume por volume
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
µmol ou µM	Micromol

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	iv
Lista de abreviaturas e siglas	v
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO GERAL.....	12
3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
5. RESULTADOS.....	29
5.1. Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a evolução temporal do peso dos animais.....	30
5.2. Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a evolução temporal do consumo de ração pelos animais.....	30
5.3. Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a evolução temporal da ingestão de líquido pelos animais.....	31
5.4. Avaliação dos níveis sanguíneos de etanol no modelo experimental de consumo crônico de etanol.....	32
5.5. Efeito do tratamento crônico com etanol sobre os valores de pressão arterial e frequência cardíaca dos animais.....	33
5.6. Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a atividade plasmática da renina.....	34
5.7. Efeito do consumo crônico de etanol sobre os níveis plasmáticos de ANG I e ANG II.....	34
5.8. Efeito do consumo crônico de etanol sobre os níveis teciduais de ANG I e ANG II.....	35
5.9. Efeito do consumo crônico de etanol sobre a atividade plasmática e tecidual da Enzima Conversora de Angiotensina.....	36
5.10. Efeito do consumo crônico de etanol sobre os níveis plasmáticos de aldosterona.....	37

5.11. Efeito do consumo crônico de etanol sobre a osmolaridade e sódio plasmático de ratos.....	38
5.12. Efeito do consumo crônico de etanol sobre os níveis plasmáticos de peptídeo natriurético atrial (ANP), vasopressina (AVP) e ocitocina (OT).....	38
5.13. Efeito do consumo crônico de etanol sobre os níveis plasmáticos de corticosterona.....	39
5.14. Efeito do consumo crônico de etanol sobre espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no plasma de ratos.....	40
5.15. Efeito do consumo crônico de etanol sobre produção de O_2^- em aorta e leito arterial mesentérico de ratos.....	41
5.16. Efeito do consumo crônico de etanol sobre a atividade da SOD no plasma de ratos.....	41
5.17. Efeito do consumo crônico de etanol sobre os níveis de H_2O_2 no plasma de ratos.....	42
5.18. Efeito do consumo crônico de etanol sobre a atividade antioxidante total no plasma de ratos.....	43
5.19. Efeito do consumo crônico de etanol sobre os níveis de nitrato plasmático e tecidual.....	43
5.20. Efeito do consumo de etanol sobre a reatividade vascular.....	44
5.21. Efeito do consumo crônico de etanol sobre a expressão gênica.....	47
5.22. Efeito do consumo crônico de etanol sobre a expressão protéica.....	55
6. DISCUSSÃO.....	66
7. CONCLUSÃO.....	80
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82



Fonte: Autor desconhecido.

1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares matam anualmente 17 milhões de pessoas em todo o mundo. Essa realidade atinge também países em desenvolvimento como Brasil, onde são as principais causas de morte, sendo responsáveis por 20 a 30% do total de óbitos (HERNANDEZ-HERNANDEZ *et al.*, 1998, VI DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL, 2010). Segundo a I Diretriz de Prevenção Cardiovascular (2013), em uma década, cerca de 7,6 milhões de mortes no mundo foram atribuídas à hipertensão arterial sistêmica (HAS), sendo a maioria em países de baixo e médio desenvolvimento econômico. São vários os fatores de risco que contribuem para o desenvolvimento da HAS, onde se destaca o consumo de bebidas alcoólicas (CAIRNS *et al.*, 1984). Di castelnuovo *et al.* (2009) demonstraram que o etanol é uma das principais variáveis de comorbidade associadas ao aumento da incidência de doenças cardiovasculares. Em indivíduos hipertensos, a ingestão de etanol, agudamente e dependentemente da dose, reduz a pressão arterial, porém ocorre a elevação algumas horas após o seu consumo. Assim, orientase, atualmente, o valor limítrofe da ingestão alcoólica de 30 g ao dia para homens, de preferência não - habitualmente; sendo a metade deste valor indicado às mulheres (XIN *et al.*, 2001, O'KEEFE; BYBEE; LAVIE, 2007).

O aumento da pressão arterial associado ao consumo crônico de etanol é um fenômeno amplamente documentado na literatura científica. Há quase um século, foi publicado estudo clínico pioneiro realizado na França, que estabeleceu relação positiva entre o aumento da pressão arterial e o consumo de etanol (LIAN, 1915). Inúmeros estudos subseqüentes demonstraram que 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 (KLATSKY *et al.*, 1977; MILON *et al.*, 1982; KLATSKY *et al.*, 1986; VANDER, 1988; FUCHS *et al.*, 2001; SKLIROS *et al.*, 2012). MacMahon (1987) compilou vários estudos clínicos transversais, realizados após o resultado obtido por Lian (1915), e fortaleceu a associação entre o consumo crônico de etanol e o aumento na pressão arterial sistêmica. Apesar de estar bem estabelecida a relação entre consumo crônico de etanol e a hipertensão arterial, os mecanismos envolvidos nessa resposta não são totalmente elucidados.

Nas últimas décadas vários estudos clínicos e experimentais foram desenvolvidos na tentativa de compreender os mecanismos pelas quais o etanol favorece a elevação da pressão arterial e o desenvolvimento da HAS, entretanto sem afetar a frequência cardíaca (CLARCK, 1985, ABDEL-RAHMAN; WOOLES, 1987). Foram observadas elevações da pressão arterial sistólica e diastólica (17,6 e 10,9 mmHg, respectivamente) de indivíduos que consumiam etanol diariamente, quando comparados a indivíduos que não faziam o consumo dessa substância (SAUNDERS; BEEVERS; PATON, 1981). Chan *et al.* (1985) utilizando de um modelo animal crônico de etanol (20% por 12 semanas), demonstrou um aumento significativo das pressões arteriais sistólica, diastólica e média. Também se constatou uma elevação da pressão arterial sistêmica de ratos tratados cronicamente com etanol durante 13 semanas (WILLIAMS; ADAMS, MUSTAFA, 1990). Os estudos de Husain *et al.* (2004 e 2011) também evidenciaram aumento das pressões arteriais sistólica, diastólica e média em um tratamento crônico de etanol (20% por 12 semanas). Silva *et al.* (2004) verificaram elevação da pressão arterial em ratos após 28 dias de tratamento com etanol 6,7% v/v. Resstel *et al.* (2006) demonstraram elevação na pressão arterial de ratos após o tratamento com etanol durante duas, seis e dez semanas. Tirapelli *et al.* (2008) constataram elevação significativa na pressão arterial de animais tratados com etanol por duas semanas. Husain *et al.* (2008) e Resstel *et al.* (2008) demonstraram uma correlação positiva da quantidade, duração da ingestão de etanol e desenvolvimento na hipertensão em ratos. Silva *et al.* (2013) confirmaram a associação positiva entre o consumo crônico de etanol e a elevação da pressão arterial sistêmica, constatando também um aumento significativo nas pressões sistólica, diastólica e média, sem alteração na frequência cardíaca, em animais tratados com etanol durante quatro semanas. Como consequência deste conjunto de estudos, algumas teorias foram aventadas para explicar a hipertensão arterial associada ao consumo crônico de etanol. Entre os mecanismos propostos destacam-se as alterações na contratilidade vascular, promoção do estresse oxidativo, estimulação do sistema nervoso simpático e alterações neuro-humorais.

Em relação ao mecanismo neuro-humoral, tem sido descrito que o consumo crônico de etanol resulta em alterações nos sistemas que controlam a liberação de substâncias endógenas envolvidas na manutenção das funções vasculares. Estudos demonstram que o etanol é capaz de modular a atividade do sistema renina angiotensina (SRA) (ZANCHETTI *et al.*, 1976; NIEMINEN *et al.*; 1981; YOGI *et al.*, 2012).

O octapeptídeo angiotensina II [Ang-(1-8)] é o componente biologicamente ativo do SRA. Esse peptídeo é produzido sistemicamente pelo SRA clássico onde a enzima renina

circulante, produzida pelos rins, cliva a porção N-terminal da globulina de alto peso molecular, o angiotensinogênio, produzida pelo fígado. A ação da renina sobre o angiotensinogênio gera o decapeptídeo angiotensina I [Ang-(1-10)] (ANG I) biologicamente inerte, que é hidrolisado a angiotensina II (ANG II) pela remoção do dipeptídeo C-terminal, por ação da enzima conversora de angiotensina plasmática (ECA) (PHILLIPS *et al.*, 1993). Os componentes do SRA também foram descritos nos vasos, indicando que o tecido vascular é capaz de produzir ANG II localmente. Alguns estudos sugerem também a existência de um SRA tecidual, como descrito no coração e em vasos sanguíneos (HOLLENBERG; FISHER; PRINCE, 1998).

Thevananther e Brecher (1994) demonstraram que tanto o etanol quanto seu metabólito, o acetaldeído, são capazes de estimular o SRA, observado pelo aumento dos níveis plasmáticos de ANG I e ANG II. A ativação do SRA também foi observada em outros estudos pela elevação dos níveis de renina, bem como de sua atividade (LINKOLA; FYHRQUIST; YLIKAHRI, 1979; LINKOLA *et al.*, 1980; WRIGHT *et al.*, 1986; THEVANANTHER; BRECHER, 1994; XAIO; PUDDEFOOT; VINSON, 2000; YOGI *et al.*, 2012). Igc e Behnia (2003); Polikandriots *et al.* (2006) e Yogi *et al.* (2012) verificaram o aumento da atividade da ECA decorrente ao tratamento com etanol. Silva *et al.* (2013) também constataram a ativação do SRA resultante do aumento da atividade da renina, da elevação plasmática de ANG I e ANG II, e aumento da atividade da ECA, induzidos pelo tratamento crônico com etanol. Entretanto, o mecanismo exato pela qual o etanol estimula o sistema renina angiotensina ainda não está totalmente elucidado. Wright *et al.* (1986) sugerem que o etanol induza uma desidratação e subsequente hipovolemia, considerados estímulos para a síntese e liberação de renina pelas células do aparelho justaglomerular, principalmente pelas células das arteríolas renais aferentes, e conseqüente ativação do SRA.

A ANG II tem seus efeitos mediados por seus receptores do tipo 1 e 2 (AT₁ e AT₂, respectivamente) (KASCHINA; UNGER, 2003). Os receptores AT₁ compõe a família dos receptores acoplados à proteína Gq na membrana plasmática e são expressos nas células do músculo liso vascular e endotélio, onde são responsáveis por diversos processos fisiológicos e fisiopatológicos.

A participação do receptor AT₁ sob os efeitos promovidos pela ANG II pode ser constatada pela utilização de drogas que atuam como antagonistas competitivos, tais como o losartan (WONG *et al.*, 1990; PALS; COUCH, 1993). Tal antagonista é amplamente utilizado como ferramenta farmacológica desde a sua produção nos anos de 1990, devido a alguns de seus aspectos, tais como a ação de longa duração e a ausência de atividade agonista no

receptor. O losartan é rapidamente absorvido e torna-se ativo após sofrer metabolização, EXP-3174, via o sistema hepático do citocromo P-450. O pico de efeito da droga sobre a pressão arterial sistêmica ocorre após seis horas do tempo de administração e possui meia-vida de 2,1 horas para o losartan e 6,3 horas na sua forma metabolizada, além de possuir uma cinética linear (MCINTYRE *et al.*, 1997). O losartan promove significativa redução na pressão arterial sistólica e diastólica após 24 horas após a sua administração (50 mg) e exerce seu efeito máximo de quatro a seis semanas de uso (GRADMAN; ARCURI; GOLDBERG, 1995). Tais dados em conjunto justificam a ampla utilização deste antagonista em estudos experimentais (JENKIS *et al.*, 1995; GOA; WAGSTAFF, 1996).

A ANG II sintetizada exerce diversas funções no organismo tais como o de secreção de aldosterona, contração vascular, sede, apetite ao sódio (Na^+), além de atuar sobre a produção de óxido nítrico (NO) (TOUYZ; SCHIFFRIN, 2000; KASCHINA; UNGER, 2003; WATANABE; BARKER; BERK, 2005).

O sistema renina angiotensina é um dos principais sistemas controladores da homeostasia hidroeletrolítica, através da síntese e liberação de hormônios mineralocorticóides, principalmente a aldosterona (ZANCHETTI *et al.*, 1976; NIEMINEN *et al.*; 1981; YOGI *et al.*, 2012). A ANG II, via receptores AT_1 , tem um importante papel estimulante para a secreção de aldosterona, pela zona glomerulosa do córtex adrenal (RICE; RICHTER, 1943; DE NICOLA *et al.*, 1992).

A aldosterona é o principal hormônio regulador do balanço entre os níveis de sódio e potássio, e também atua regulando o volume extracelular. Tal regulação se dá pela reabsorção de sódio pelos túbulos distais e coletores, associado a excreção de potássio. Assim como a aldosterona, os íons sódio e cloreto (Cl^-), por serem os principais solutos do líquido extracelular desempenham um importante papel sobre o controle do volume de água no organismo, sobretudo do volume do líquido extracelular (LEC) e intravascular (volemia) (SOKABE, 1974; COWLEY; ROMAN, 1989; TAKEI, 2000). Assim, qualquer alteração neste sistema contribuiria negativamente sobre o controle hidroeletrolítico.

Estudos já demonstraram que a administração crônica de etanol influencia na síntese de aldosterona, nos níveis plasmáticos de Na^+ e conseqüentemente na osmolaridade plasmática (HOSTETLER; RICHMAN, 1982; NIEMINEN *et al.*, 1981; COLLINS *et al.*, 1992). Assim, a aldosterona produzida é capaz de promover o aumento da reabsorção de Na^+ e alterar a osmolaridade plasmática, resultando no aumento da pressão arterial sistêmica (SILVA *et al.*, 2013).

A osmolaridade plasmática expressa a razão entre a quantidade total do soluto dissolvido em uma determinada massa de água, sendo o sódio o principal soluto extracelular e o mais efetivo na regulação do gradiente osmótico entre os compartimentos intra e extracelulares (ANTUNES-RODRIGUES *et al.*, 2004). Allen *et al.* (1998, 1999) demonstraram que estas pequenas alterações da osmolaridade plasmática são suficientes na promoção de um quadro de hiperosmolaridade, aumento da pressão arterial e conseqüente ativação dos barorreceptores, que posteriormente favorece o início de respostas endócrinas. Collins *et al.* (1992) demonstraram que o consumo crônico de etanol é capaz de induzir a hiperosmolaridade e elevar os níveis plasmáticos no Peptídeo Natriurético Atrial (ANP), que atua como preditor de fatores de risco para as doenças cardiovasculares.

O sistema nervoso central (SNC) também atua na regulação da pressão arterial sob condições fisiopatológicas, tais como no consumo crônico de etanol (THOMAS, 2001; ISRAEL; SOSA-CANACHE, 2002). Um dos mecanismos pelas quais o SNC regula o efeito pressórico é através da modulação do eixo hipotálamo-neurohipofisário, onde se encontram os neurônios responsáveis pela síntese e liberação dos hormônios vasopressina (AVP) e ocitocina (OT) à circulação sistêmica (ANTUNES-RODRIGUES *et al.*, 2004). Diversos estudos da literatura já sugeriram efeito sinérgico da vasopressina e da ocitocina na indução do aumento de AMP_c e da natriurese, e uma relação inversamente proporcional entre os níveis plasmáticos de ANP etanol (THOMAS, 2001; ISRAEL; SOSA-CANACHE, 2002; ANTUNES-RODRIGUES *et al.*, 2004).

Além dos efeitos fisiológicos de controle da função cardiovascular, a ANG II também está envolvida na fisiopatologia de doenças cardiovasculares uma vez que esse peptídeo induz a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) no endotélio e no músculo liso vascular (TOUYZ; SCHIFFRIN, 2000). Esse processo ocorre via receptores AT₁ e conseqüente ativação da enzima NAD(P)H oxidase (ZAFARI *et al.*, 1998; LUTHER; BROWN, 2011). Assim, a ativação da NAD(P)H oxidase produz ERO através de reações redox (redução-oxidação). A ANG II estimula a atividade da NAD(P)H oxidase através de várias fosfolipases incluindo a PLC, PLA₂ e a PLD (CAT *et al.*, 2012). Nesse sentido, Polikandriotis *et al.* (2006) descreveram ativação da NAD(P)H oxidase e aumento dos níveis de ânions superóxido (O₂⁻) no pulmão de ratos tratados com etanol, sendo essa resposta bloqueada pelo lisinopril, um inibidor da ECA. Husain *et al.* (2008) detectaram níveis elevados de ANG II no plasma e aorta de animais tratados cronicamente com etanol. Juntos esses estudos sugerem que a ativação do SRA induzida pelo consumo crônico de etanol desempenha função importante no estresse oxidativo tecidual.

A ANG II ativa a enzima NAD(P)H oxidase que é responsável pela produção de O_2^- pela redução da molécula de oxigênio, via subunidade catalítica (Nox), no sistema cardiovascular (TOUYZ; SCHIFFRIN, 2000). Posteriormente, O_2^- é dismutada a H_2O_2 (peróxido de hidrogênio) pela enzima Superóxido Dismutase (SOD) ou reage com o NO para a formação de peroxinitrito ($ONOO^-$) principalmente em condições fisiopatológicas (BRIONES; TOUYZ, 2010).

A NAD(P)H protótipo é encontrada em neutrófilos e tem cinco subunidades: p47phox, p67phox, p40phox, p22phox e a subunidade catalítica gp91phox (também chamada Nox2) (BABIOR, 2004; TOUYZ; PARAVICINI, 2008). A NAD(P)H oxidase encontra-se normalmente em seu estado inativo, mas após estimulação celular, as subunidades citosólicas p47phox e p67phox translocam para a membrana onde se associam ao citocromo 558, resultando em ativação rápida da oxidase.

A importância da NAD(P)H oxidase nos processos envolvidos com a hipertensão induzida pela ANG II é amplamente demonstrada em estudos com modelos de infusão de ANG II. Em células endoteliais e do músculo liso vascular, a subunidade p47phox tem se mostrado essencial para a produção de ERO em resposta a ANG II (LI *et al.*, 2003). Landmesser *et al.* (2002) verificaram um bloqueio da resposta pressórica induzida pela infusão de ANG II em camundongos deficientes em p47phox.

Os mecanismos pelas quais a ANG II regula a família da NAD(P)H e induz seus efeitos são complexos e envolvem níveis gênicos, pré e pós transcricionais, e envolvem várias moléculas sinalizadoras intracelulares (CAT *et al.*, 2012). Estudos como o de Cat *et al.* (2012), sugerem que as ERO formadas são capazes de influenciar a sinalização de importantes moléculas reguladoras da função vascular.

As ações da ANG II, via receptores AT_1 , são reguladas por complexas cascatas intracelulares de transdução de sinais que geram efeitos vasculares de curto prazo, como a contração vascular, e efeitos em longo prazo como o crescimento celular e inflamação.

Em curto prazo, a interação entre a ANG II e o receptor AT_1 induz a fosforilação e subsequente ativação da fosfolipase C (PLC), da Src, da fosfolipase D (PLD), da fosfolipase A_2 (PLA_2), das tirosinas quinases e das quinases ativadas por mitógenos (MAPKs). Assim, a contração vascular induzida pela ANG II é mediada por diversos processos de transdução de sinais que envolvem: ativação da PLC pela proteína Gq, levando a produção de trifosfato de inositol (IP_3) e diacilglicerol (DAG); subsequente elevação intracelular de cálcio pelo aumento do influxo e mobilização intracelular de cálcio; ativação da PKC; alteração no pH (alcalinização) estimulada pela bomba Na^+/H^+ ; mudanças nas concentrações intracelulares de

sódio e magnésio; e ativação da família das Src quinases (TOUYZ; SCHIFFRIN, 2000). A ativação de tirosina quinase que ativa a via das Src, enzimas que normalmente interagem com receptores acoplados a tirosina quinase (TOUYZ; PARAVICINI, 2008). As proteínas da família tirosina quinase já foram descritas como importante via de transdução de sinal na regulação do tônus e nos níveis de cálcio na musculatura lisa vascular (KIM *et al.*, 1998). No entanto, as Src também interagem com receptores acoplados à proteína Gq, como o receptor AT₁ (PAXTON *et al.*, 1994; ISHIDA *et al.*, 1998) e estabelecem o elo entre o receptor AT₁ e a ativação da via de sinalização mediada pelas proteínas quinase ativadas por mitógenos (MAPKs – *Mitogen-Activated Protein Kinases*) e PI3K, no músculo liso vascular (ISHIDA *et al.*, 1998).

As MAPKs fazem parte da cascata de sinalização intracelular que controla processos como a contração vascular (TOUYZ; SCHIFFRIN, 2000). Pelo menos três cascatas de MAPKs 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* ou *stress activated protein kinase*). Estudos constataram que a ativação das MAPKs requer a formação das ERO e a ativação da Nox, pois na presença de inibidores e de antioxidantes atenuam a ativação das MAPKs induzida pela ANG II (TOUYZ *et al.*, 2003).

Várias vias de sinalização podem atuar nos mecanismos pelas quais o etanol induz a vasoconstrição periférica. É importante notar que o consumo de etanol está associado à ativação da via das MAPKs. Estudos prévios já demonstravam a via das MAPKs como moduladora da contratilidade da musculatura lisa vascular, sendo a tirosina quinase e a MAPKK ativadas em estímulo ao etanol (LAGAUD *et al.*, 1999; ZHENG *et al.*, 1997). Sachinidis *et al.* (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 $[Ca^{2+}]_i$ 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 $[Ca^{2+}]_i$ induzida pelo etanol em aorta de ratos (YANG *et al.*, 2002). Paravicini; Touyz (2006) demonstraram que a ANG II induz a ativação da MAPKp38 dependente de H₂O₂, e que ambos medeiam o efeito contrátil induzido pela ANG II. Demonstraram também, que a ativação da MAPKp38 pode estar envolvida nas alterações funcionais e estruturais observadas na HAS.

A participação das proteínas quinases na resposta contrátil induzida pelo etanol em aorta em ratos também foi estabelecida pela utilização do PD-98059 (inibidor seletivo da MAPKK), do SB-203580 (inibidor seletivo da p38 MAPK) e do U0126 (um potente e seletivo inibidor da MEK 1/MEK 2) (ALESSI *et al.*, 1995; FAVATA *et al.*, 1998). O estudo de Yang *et al.* (2001) demonstrou que o etanol recruta as MAPKs para exercer seu efeito contrátil sobre a musculatura lisa das artérias cerebrais de cães. Yang *et al.* (2002) verificaram um forte indício de ativação das vias MAPKK e MAPK em aorta de ratos, considerando assim, importantes vias envolvidas na resposta contrátil induzida pelo etanol.

Como descrito, o consumo crônico de etanol é capaz de induzir o processo de estresse oxidativo, e associado a ele também se observa alteração dos mecanismos miogênicos que envolvem o aumento da reatividade vascular para agentes vasoconstritores (PINARDI *et al.*, 1992). Em relação às alterações nas respostas contráteis induzidas pelo etanol, estudos já demonstraram um favorecimento da resposta contrátil aos agonistas dos α_1 -adrenoceptores, tais como a fenilefrina. Utkan *et al.* (2001) também observaram um favorecimento da resposta contrátil em aorta de animais tratados cronicamente com etanol. Entretanto, Tirapelli *et al.* (2008) não constataram favorecimento à resposta contrátil da fenilefrina em vasos de resistência, como o leito arterial mesentérico, de animais tratados com etanol por duas semanas, porém tal favorecimento foi constatado após seis semanas de tratamento. Hatton *et al.* (1992) observaram aumento da resposta contrátil à noradrenalina em artérias mesentéricas de ratos, tratados com solução de etanol 36% durante 18 semanas. Kahonen *et al.* (1999) demonstraram, em animais experimentais, as alterações no controle do tônus vascular arterial possivelmente ocorriam através da produção e / ou liberação de fatores relaxantes derivados do endotélio (EDRF – *Endothelium-derived relaxing factors*). Tirapelli *et al.* (2006) mostraram que o aumento da contração à fenilefrina em aorta, induzida pelo consumo de etanol, não é dependente do endotélio e está relacionado ao aumento do influxo de Ca^{2+} extracelular mediado pelo tromboxano A_2 . Foi observado ainda que a indometacina, um inibidor não seletivo das ciclooxigenases reverteu o aumento de contração à fenilefrina induzida pelo etanol, sugerindo a participação dessas enzimas nessa resposta. Uma vez que os receptores AT_1 estão envolvidos na geração de ERO e ativação da sinalização redox (SCHIFFRIN; TOUYZ, 2000) é possível que o aumento da contração à fenilefrina seja mediado por um aumento da expressão da ciclooxigenase-2 com conseqüente aumento da produção de tromboxano A_2 (TIRAPELLI *et al.*, 2006, YOGI, 2010). Neste sentido, Viridis; Durantin e Taddei (2011) relataram a interação entre a ANG II e a via da COX na patogênese das injúrias vasculares, onde de acordo com o modelo experimental do estudo prevaleceu a

via da COX-1 ou COX2. Os autores também propuseram que as ERO formadas por indução da ANG II estimulam a atividade da COX-1, que ao produzir prostanoídes contráteis como o tromboxano A₂, contribuem para a disfunção endotelial e vascular provenientes no desenvolvimento da HAS. A participação da ANG II na estimulação da COX pode também ser constatada pela utilização do antagonista AT₁, onde se observou a abolição no aumento da expressão gênica da COX2 induzida pela ANG II.

O estresse oxidativo, além do aumento na produção de ERO e seus efeitos, também se associa à disfunção endotelial, redução na capacidade antioxidante e redução da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) (BRIONES; TOUYZ, 2010). As ERO formadas são capazes de iniciar uma peroxidação lipídica da membrana celular, levando a produção de mediadores inflamatórios e promovendo a depleção dos sistemas antioxidantes do organismo (HUSAIN *et al.*, 2010). Touyz e Schiffrin (2010) mostraram que elevadas concentrações plasmáticas de malondialdeído (MDA), um marcador de peroxidação lipídica, tem sido demonstradas em pacientes com hipertensão, enquanto reduzidas concentrações plasmáticas de superóxido dismutase (SOD) tem sido observadas.

Laursen *et al.* (1997) utilizando um modelo experimental de infusão de ANG II, observaram uma elevação na produção das ERO e uma diminuição da capacidade antioxidante. Husain *et al.* (2007) também observaram uma redução na capacidade antioxidante de animais tratados cronicamente com etanol.

Estudos demonstraram que a associação entre a disfunção endotelial e o desenvolvimento do processo hipertensivo (SCHLAICH *et al.*, 2004; YANG *et al.*, 2007).

A eNOS é a principal enzima no endotélio vascular, responsável por catalisar o transporte de elétrons mediada por flavina de um doador de elétrons, o NADPH, para um grupo prostético heme. Para tal, a eNOS necessita de L-arginina como substrato para a formação de NO, quanto de fator tetrahydrobiopterina (BH₄). A óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) é um sistema enzimático constitutivamente delegado à produção de NO, também pode contribuir na formação das ERO em condições caracterizadas pela deficiência no substrato arginina ou no cofator tetrahydrobiopterina (BH₄). Tal condição é denominada de “desacoplamento da NOS” e implica na redução da atividade desta enzima em produzir NO e favorecer a produção de ERO. Landmesser; Dikalov; Price (2003) e YAN; TIE; MESSINA (2012) demonstraram que condições fisiopatológicas como da HAS, favorecem o processo de desacoplamento da eNOS pelo aumento significativo da produção de ERO e redução drástica do cofator BH₄ (HIGASHI; SASAKI; NAKAGAWA, 2002). YAN; TIE; MESSINA (2012) também constataram que a infusão de tetrahydrobiopterina pode melhorar a vasodilatação

endotélio-dependente, sugerindo que em humanos, a depleção de BH₄ pode direcionar a eNOS para a formação das ERO. Assim, observa-se que em condições fisiopatológicas, como da HAS, uma redução na biodisponibilidade de NO. Husain *et al.* (2010) mostraram uma redução nos níveis plasmáticos de NO de animais tratados cronicamente com etanol. Yogi *et al.* (2012) demonstraram em um modelo agudo de etanol uma redução significativa nos níveis NO em homogenatos de artéria aorta torácica de ratos.

Kahonen *et al.* (1999) já demonstraram que o consumo crônico de etanol também é capaz de induzir o processo de estresse oxidativo através da alteração dos mecanismos miogênicos, como por exemplo, pela diminuição no efeito de agentes vasorelaxantes. Nesse sentido, Rajagopalan *et al.* (1996) constataram uma disfunção na resposta vasorelaxante induzida pela acetilcolina. Husain *et al.* (2008) mostraram redução na resposta da acetilcolina em aorta de ratos tratados com etanol 20% durante 12 semanas. Resultados semelhantes foram encontrados por Abou-Agag *et al.* (2005) em ratos tratados com solução de etanol 18% durante 8 semanas. O relaxamento da acetilcolina foi reduzido pelo tratamento com etanol 20% em leito mesentérico de rato (TIRAPELLI *et al.*, 2007). O tratamento com etanol também reduziu o efeito de relaxamento do IRL1620, um agonista seletivo dos receptores ET_B, em carótidas de rato (TIRAPELLI *et al.*, 2006b). Mais recentemente, foi observado que o tratamento crônico com etanol reduz o relaxamento induzido pelo peptídeo vasodilatador adrenomedulina em aorta e leito mesentérico de ratos (HIPÓLITO *et al.*, 2011; ROCHA *et al.*, 2012).

Os dados encontrados na literatura demonstraram a capacidade que o consumo crônico de etanol tem em induzir o aumento dos níveis de ANG II e promover a elevação da pressão arterial sistêmica. Entretanto, até o presente momento não houve relatos científicos que comprovassem a real associação entre o consumo crônico de etanol e a ativação do sistema renina angiotensina, via receptor AT₁, como mecanismo principal do aumento da pressão arterial sistêmica. Assim, a hipótese de nosso estudo foi a de que o consumo crônico de etanol estimule o SRA que por sua vez induz, via ativação dos receptores AT₁, a produção de ERO, processo esse que levaria a ativação da via das MAPKs, alterações da reatividade vascular, redução da biodisponibilidade do NO e ao aumento da pressão arterial. Portanto, o presente estudo foi delineado de forma a investigar a participação da ANG II nas disfunções vasculares induzidas pelo consumo crônico de etanol.



Fonte: Autor desconhecido.

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar a participação da ANG II via bloqueio dos receptores AT₁, nas disfunções cardiovasculares induzidas pelo consumo crônico de etanol.

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.1. Verificar se o consumo crônico de etanol induz alteração na pressão arterial sistólica, diastólica e média, além da frequência cardíaca e avaliar se a ANG II participa dessa resposta.

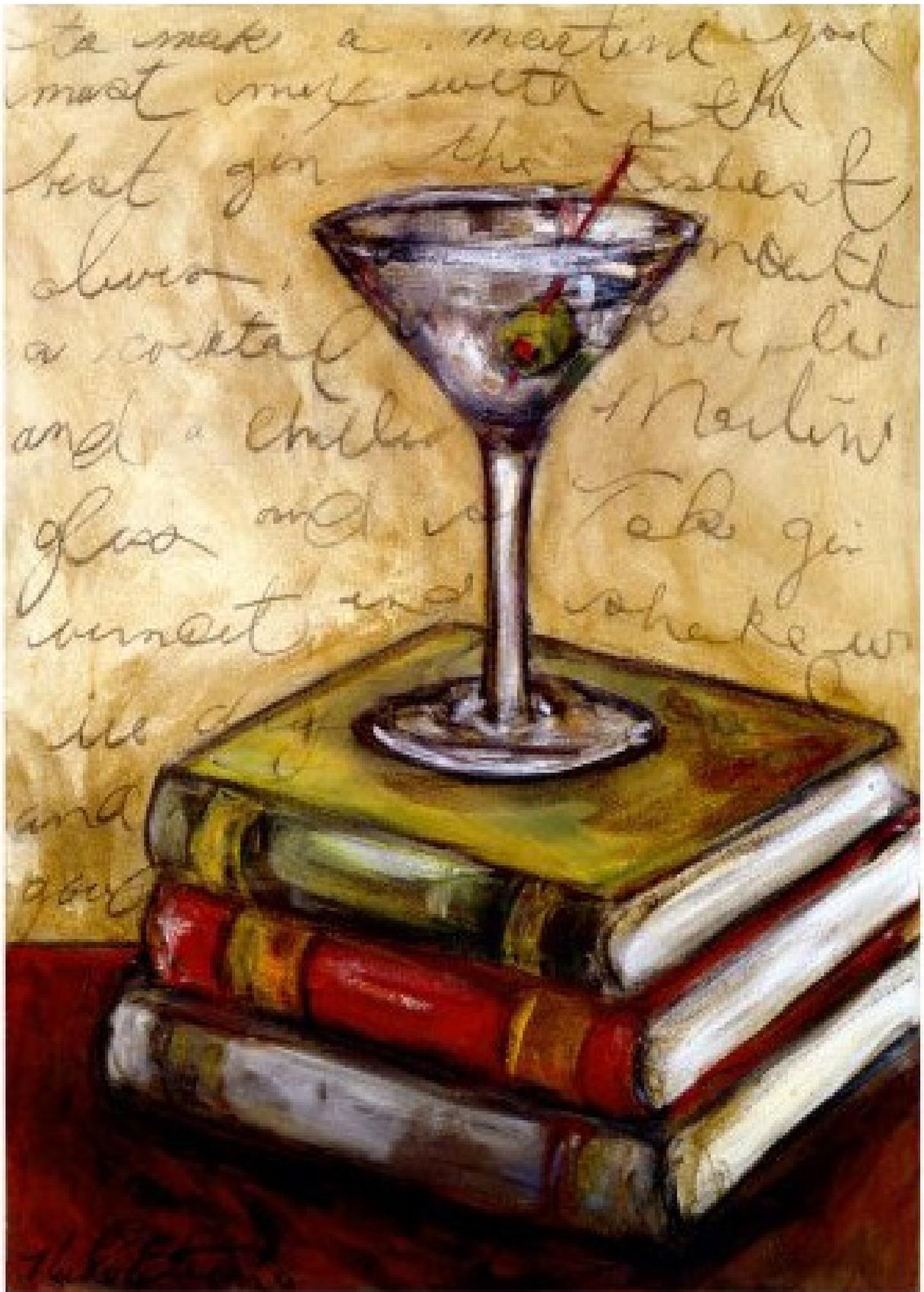
3.2. Verificar se o consumo crônico induz ativação do SRA sistêmico e tecidual (aorta e leito arterial mesentérico).

3.3. Verificar se o consumo crônico de etanol induz alteração da osmolaridade nível plasmático de sódio de ratos e avaliar se a ANG II participa dessa resposta.

3.4. Verificar se o consumo crônico de etanol induz alteração dos níveis plasmáticos do ANP, AVP, OT e corticosterona de ratos e avaliar se a ANG II participa dessa resposta.

3.5. Verificar se o consumo crônico de etanol induz estresse oxidativo sistêmico, induz a formação de O₂⁻ tecidual, altera os níveis plasmáticos de H₂O₂, e avaliar a participação da ANG II nessa resposta.

- 3.6.** Verificar se o consumo crônico de etanol induz alteração da atividade da SOD e avaliar se a ANG II participa dessa resposta.
- 3.7.** Verificar se o consumo crônico de etanol induz alteração da capacidade antioxidante total de ratos e avaliar se a ANG II participa dessa resposta.
- 3.8.** Verificar se o consumo crônico de etanol induz alteração nos níveis de nitrato plasmático e tecidual e avaliar a participação da ANG II nessa resposta.
- 3.9.** Verificar se o consumo crônico de etanol induz alteração da reatividade vascular em aorta de ratos e avaliar se a ANG II participa dessa resposta.
- 3.10.** Verificar se o consumo crônico de etanol induz alteração da expressão do RNAm, induz ativação da via das MAPKs, das NOS, das COX, além dos componentes do SRA e avaliar a participação da ANG II nessa resposta.



Fonte: Autor desconhecido.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizados ratos *Wistar* adultos, com idade média entre 40 e 50 dias (225 - 250 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 (Protocolo: 11.1.1103.53.1) do *Campus* de Ribeirão Preto da USP. Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Psicobiologia (FFCLRP – USP), em caixas coletivas (4-5 animais por caixa), em ambiente com temperatura controlada (22 ± 2 °C), sob ciclo claro-escuro de 12 horas (luzes acesas entre as 06:00 e 18:00 horas) e com livre acesso à alimento.

4.2. Grupos experimentais

Os animais foram divididos em quatro grupos: 1) *Controle*: receberam água “*ad libitum*”; 2) *Etanol*: receberam diariamente uma solução de etanol 20% (vol./vol.) em água; 3) *Controle + Losartan*: receberam água “*ad libitum*” e losartan (10 mg/kg) diariamente por gavagem; 4) *Etanol + Losartan*: foram tratados com solução de etanol 20% (vol./vol.) e receberam losartan (10 mg/kg) diariamente por gavagem. Os animais do *grupo controle* e *grupo etanol* receberam diariamente por gavagem o veículo de diluição (água) do losartan. Os animais do *grupo etanol* e *etanol + losartan* passaram por um breve período de adaptação gradativa do consumo de etanol (TIRAPELLI *et al.*, 2006a,b, 2008). 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 (Figura 1). Os animais dos quatro grupos tiveram à disposição a mesma quantidade semanal de dieta sólida convencional. Ao término da quinta semana do início do experimento, animais dos quatro grupos foram anestesiados com Uretana (1,25 g/Kg de peso do animal, i.p.) e a aorta, o leito mesentérico e o sangue foram removidos para estudos funcionais ou bioquímicos.

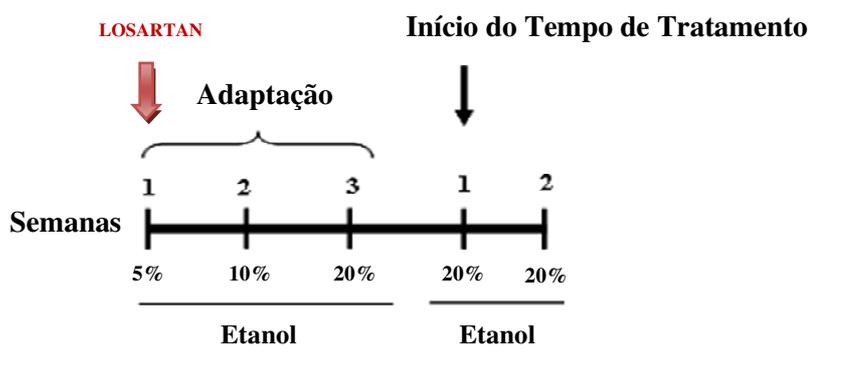


Fig.1. Esquema do tratamento crônico com etanol.

4.3. Protocolos funcionais e bioquímicos

4.3.1. *Evolução Temporal do Peso dos animais*

Foram realizadas mensurações semanais do peso de todos os quatro grupos de animais. Os resultados foram expressos em gramas (g) do peso médio dos animais de cada grupo experimental.

4.3.2. *Evolução temporal do Consumo de ração pelos animais*

Foram realizadas mensurações semanais do consumo de ração pelos animais dos grupos experimentais. Os resultados foram expressos em gramas (g) do consumo médio de ração pelos animais de cada grupo experimental.

4.3.3. *Evolução temporal da Ingestão de Líquidos pelos animais*

Foram realizadas mensurações semanais da ingestão de líquidos pelos animais dos grupos experimentais. Os resultados foram expressos em mililitros (mL) do consumo médio da ingestão de líquidos (água ou solução de etanol) pelos animais de cada grupo experimental.

4.3.4. Medida dos níveis sanguíneos de etanol

O sangue foi coletado da aorta abdominal de animais anestesiados com Uretana (1,25 g/Kg de peso do animal, i.p.), utilizando-se seringas heparinizadas. As amostras foram acondicionadas em tubos contendo o conservador fluoreto de sódio (1 mg/mL de sangue). Em seguida 100 µL das amostras foram transferidas para frascos contendo 500 µL de tampão contendo Cloreto de sódio (2g/ L de sangue) e Isobutanol (100 µL/L de sangue). Os frascos foram devidamente lacrados e colocados no Head Space HSS4A (Shimadzu, Japão). Em seguida, as amostras foram injetadas no cromatógrafo GC17A (Shimadzu, Japão). Uma curva padrão de calibração foi realizada previamente, onde diferentes concentrações conhecidas de etanol (0,02 – 20 mg/mL) foram adicionadas ao sangue de animais controle. Os resultados foram expressos em g de etanol/L de sangue.

4.3.5. Medida da pressão arterial

A pressão arterial foi aferida semanalmente pelo método de pletismografia de cauda, utilizando o pletismógrafo (Marca Insight, modelo EFF306). Os animais dos grupos experimentais anteriormente passaram por um período de adaptação e acondicionamento de três dias, onde os mesmos eram colocados no tubo de contenção para obtenção dos valores de pressão arterial. Inicialmente os animais de cada grupo experimental eram colocados em caixas e aquecidos por 20 minutos. Eram obtidas três mensurações de cada variável por animal e realizada a média dos valores obtidos para cada animal e posteriormente para cada grupo experimental. Os resultados foram expressos em mmHg para as pressões sistólica, diastólica e média, e em b.p.m. para os valores médios da frequência cardíaca.

4.3.6. Medida da Atividade plasmática da renina

A atividade plasmática da renina foi medida por radioimunoensaio seguindo recomendações do kit (Immunotech). O sangue foi coletado em um tubo contendo EDTA (0,2 mL de EDTA dissódico em 10 mL de sangue, concentração final de 6,25 mmol/L). As amostras foram imediatamente centrifugadas (3000 r.p.m. por 3 min. a 4°C) e o plasma foi congelado a -80°C. Os resultados foram expressos em ng/mL/hr.

4.3.7. Níveis plasmáticos de ANG I e II

A dosagem dos níveis plasmáticos de ANG I e II foi realizada pelo método de radioimunoensaio específico utilizando a técnica descrita por Botelho *et al.* (1994). O sangue foi coletado em seringas heparinizadas contendo o seguinte tampão: pepstatina A (0,15 mmol/L), fenantrolina (20 mmol/L), EDTA (125 mmol/L), neomicina (0,2%), etanol (2%), DMSO (2%), e calicreína (0,1 mol/L), pH 7,4. Em seguida as amostras foram centrifugadas (3.000 g, a 4°C por 30 min) para obtenção do plasma. As amostras de plasma foram purificadas utilizando-se coluna de cromatografia (Sep-Pak C18). A eluição foi feita com 2 mL de metanol-água-ácido trifluoroacético (70:29:1). Os eluídos foram evaporados “overnight” usando um speed-vac. A ANG II plasmática foi medida em amostras que foram reconstituídas em 100 µl de tampão de radioimunoensaio (0,1 mol/L de K₂HPO₄, 3 mmol/L de EDTA, 0,15 mmol/L de 8-hidroxiquinolina e 0,25% de BSA, pH 7,2), sonicadas por 5 minutos e estocadas a -20°C. A quantidade de ANG II nas amostras foi medida por radioimunoensaio utilizando-se anticorpo policlonal para ANG II. Os resultados foram expressos em pg/mL de plasma.

4.3.8. Medida dos níveis teciduais de ANG I e II

A dosagem dos níveis teciduais de ANG I e II foi realizada através do método de radioimunoensaio específico utilizando a técnica descrita por Botelho *et al.* (1994). A aorta torácica e o leito arterial mesentérico foram coletados e armazenados em criotubos a 80°C. Os tecidos foram homogeneizados em solução de etanol 70% e HCl 0,045 M contendo inibidores de peptidases (benzoato p-hidroximercurio 1mM, EDTA 10%) e 0,0043% de albumina sérica bovina (na proporção de 10 mL/g tecido). As concentrações de proteínas totais destes homogenados foram obtidas pelo método de Bradford. Em seguida os homogenatos foram centrifugados (10.000 r.p.m., durante 40 minutos a 4°C) e os sobrenadantes foram liofilizados e ressuspensos em 2 mL de ácido trifluoroacético 0,1% (TFA; Sigma Aldrich, EUA). A partir deste ponto, os tecidos foram submetidos à extração de ANG I e II em colunas Bond-Elut (Peninsula Laboratories, EUA). Para tanto, as colunas foram pré-ativadas com 4 mL de uma solução de acetonitrila a 60% (Merck, EUA) diluída em TFA 0,1% seguido de 20 mL de TFA 0,1%. Em seguida as amostras foram aplicadas individualmente nas colunas e lavadas com

mais 20 mL de TFA 0,1%. Os peptídeos absorvidos foram então diluídos em 3 mL de uma solução de acetonitrila em TFA 0,1%, sendo coletados e liofilizados. Os resultados foram expressos em pg/grama de tecido.

4.3.9. Medida da Atividade plasmática e tecidual da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA)

A atividade plasmática da ECA foi medida por fluorescência utilizando a técnica descrita por Sentandreu e Toldrá (2006). O sangue foi coletado da aorta abdominal utilizando-se seringas heparinizadas. As amostras foram centrifugadas a 3.000 r.p.m. por 10 minutos, acondicionadas em criotubo e estocadas à -80°C . A aorta torácica e o leito arterial mesentérico foram coletados e armazenados em criotubos a 80°C . Os tecidos foram homogeneizados em tampão de homogeneização contendo zinco. Foram preparados os reagentes necessários para a realização do ensaio, sendo eles o tampão B (1,82 g de TRIS diluído em 100 mL de água destilada, pH: 8,3), tampão C (6,57 g de NaCl diluído em 100 mL de tampão B), substrato (3 mg do substrato Abz-Gly-p-nitro-Phe-Pro-OH marca Bachem, código M-1100 diluído em 13,7 mL do tampão C) e captopril (21,7 mg de captopril diluído em 10 mL de água destilada, denominada solução estoque 10^{-2} mol/L). As amostras foram divididas em dois grupos para o ensaio: o grupo denominado Atividade composto de 5 μL amostra, 95 μL de tampão B e 200 μL de substrato; e o grupo Inibidor da ECA composto de 5 μL amostra, 92 μL de tampão B, 3 μL de captopril e 200 μL de substrato, além do Branco composto de 100 μL e 200 μL de substrato. Cada grupo do ensaio ficou em incubação em temperatura ambiente por 24 horas e após foram dispostos em uma placa preta. Foi realizada a leitura no fluorímetro utilizando 365 nm de excitação e 415 nm de emissão. A atividade da ECA plasmática foi determinada subtraindo os valores obtidos na fluorescência obtidos na presença do captopril daqueles na ausência do mesmo. Os resultados foram expressos em Unidades Relativas de Fluorescência (URF) para as amostras de plasma, e em URF/mg de proteína da amostra do tecido.

4.3.10. Medida dos níveis plasmáticos de Aldosterona

O nível plasmático da aldosterona foi medida seguindo recomendações do kit Enzyme-linked Immunosorbent Assay (Marca Uscn Life Science Inc., código E9011Ra). O sangue foi

coletado da aorta abdominal utilizando seringas heparinizadas. As amostras foram imediatamente centrifugadas (3000 r.p.m. por 3 min. a 4°C) e o plasma foi congelado a -80°C. Os resultados foram expressos em pg/mL.

4.3.11. Medida da osmolaridade no plasma

O sangue foi coletado da aorta abdominal utilizando seringas heparinizadas. As amostras foram imediatamente centrifugadas (3000 r.p.m. por 3 min. a 4°C) e o plasma foi congelado a -80°C. A osmolaridade plasmática foi determinada pelo método do abaixamento do ponto de congelamento da água utilizando um Micro-osmômetro (Precision System, INC.). Os valores foram expressos em mOsm.

4.3.12. Medida dos níveis plasmáticos de Na⁺

O sangue foi coletado da aorta abdominal utilizando-se seringas heparinizadas. As amostras foram imediatamente centrifugadas (3000 r.p.m. por 3 min. a 4°C) e o plasma foi congelado a -80°C. Após a coleta das amostras de plasma, o conteúdo de Na⁺ dos mesmos foi quantificado por meio de fotometria de chama (Micronal – Modelo b262, Brasil). Para quantificação do Na⁺, o plasma foi diluído (1:100). Todas as aferições foram realizadas em duplicata. Os valores foram expressos em mEq/L.

4.3.13. Medida dos níveis plasmáticos do peptídeo natriurético atrial (ANP)

A dosagem dos níveis plasmáticos de ANP foi realizada pelo método de radioimunoensaio específico utilizando a técnica descrita por Haanwinckel *et al.* (1995). As mesmas amostras de plasma coletados para as dosagens de ANG I e II, foram posteriormente ressuspendidas e sonicadas em 500 µL de tampão do ensaio. Após este procedimento, 100 µL foram coletados para a realização da técnica de radioimunoensaio. Os valores foram expressos em pg/mL.

4.3.14. Medida dos níveis plasmáticos de vasopressina (AVP) e ocitocina (OT)

As dosagens dos níveis plasmáticos de AVP e OT foram realizadas pelo método de radioimunoensaio específico utilizando as técnicas descritas por Robertson *et al.* (1973) e Gutkowska *et al.* (1984). A AVP e a OT foram extraídas do plasma com acetona e éter de petróleo: um mL de plasma foi transferido para um tubo contendo 2 mL de acetona gelada (Merck, Brasil), seguido por agitação de 30 segundos e centrifugação (2500 r.p.m., 25 min., 4°C); a seguir, o sobrenadante foi decantado para um tubo contendo 2 mL de éter de petróleo (Reagen, Brasil), sendo submetido a agitação e reservado durante 2 min.; o sobrenadante (éter de petróleo) foi desprezado por aspiração e o líquido restante (acetona) contendo a AVP e a OT foi submetido ao processo de liofilização. No momento do ensaio, o produto liofilizado foi ressuspensão com 250 µL de tampão do ensaio. Realizamos a dosagem de proteínas pelo método de Bradford (BioRad, EUA) e, em seguida, o homogeneizado restante foi diluído na proporção de 1:20.000 para a realização dos radioimunoensaios. Os valores foram expressos em pg/mL.

4.3.15. Medida dos níveis plasmáticos de Corticosterona

A dosagem dos níveis plasmáticos de corticosterona foi realizada pelo método de radioimunoensaio específico utilizando a técnica descrita por Castro *et al.* (1995). O sangue foi coletado da aorta abdominal utilizando-se seringas heparinizadas. As amostras foram imediatamente centrifugadas (3000 r.p.m. por 3 min. a 4°C) e o plasma foi congelado a -80°C. A extração da corticosterona foi realizada a partir da adição de 1 mL de etanol (4°C) em 25 µL de plasma, sendo logo submetido à centrifugação (2500 r.p.m., 15 minutos, 4°C). Em seguida, o sobrenadante foi transferido para outro tubo e liofilizado. No momento do ensaio, o produto liofilizado foi ressuspensão com 1,5 mL de tampão de ensaio e pipetado em duplicata. Os valores foram expressos em pg/mL.

4.3.16. Determinação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no plasma

O sangue foi coletado em seringas heparinizadas. Em seguida, as amostras foram imediatamente centrifugadas (1000 g por 10 min. a 4°C) e o plasma foi congelado a -80°C. A determinação das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico foi medida seguindo recomendações do kit (TBARS Assay Kit, Cayman, código 10009055). O cálculo da concentração de TBARS foi feito por meio de uma curva padrão de bis-malonaldeído (MDA) e os resultados foram representados como nmol/mL de plasma.

4.3.17. Detecção de O_2^- pelo método de quimioluminescência da lucigenina

Os tecidos (aorta e leito arterial mesentérico) foram homogeneizados 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 NAD(P)H (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 durante 3 minutos. O conteúdo protéico das amostras será analisado pelo método de Lowry (Bio-Rad, EUA). Os resultados foram normalizados pela concentração protéica de cada amostra e expressos como URL (unidades relativa de luz) /mg de proteína.

4.3.18. Medida da Atividade plasmática da superóxido dismutase (SOD)

A atividade plasmática da SOD foi medida seguindo recomendações do kit Superoxide Dismutase Assay (Marca Cayman, código 706002). O sangue foi coletado da aorta abdominal utilizando seringas heparinizadas. As amostras foram imediatamente centrifugadas (3000 r.p.m. por 3 min. a 4°C) e o plasma foi congelado a -80°C. Os resultados foram expressos em U/mL.

4.3.19. Determinação dos níveis de H_2O_2 no plasma

O sangue foi coletado em seringas heparinizadas. Em seguida, as amostras foram imediatamente centrifugadas (1000 g por 10 min. a 4°C) e o plasma foi congelado a -80°C. A determinação das espécies reativas de oxigênio foi medida por ELISA, seguindo recomendações do kit (Hydrogen Peroxide Assay Kit, abcam, código ab102500). Os resultados foram expressos em pmol/ μ l.

4.3.20. Determinação da capacidade antioxidante total no plasma

O sangue foi coletado em seringas heparinizadas. Em seguida, as amostras foram imediatamente centrifugadas (1000 g por 10 min. a 4°C) e o plasma foi congelado a -80°C. A determinação da capacidade antioxidante total foi obtida, seguindo recomendações do kit (Antioxidant Assay Kit, Cayman, código 709001). Os resultados foram expressos em Mm/mL.

4.3.21. Determinação dos níveis de nitrato plasmático

O sangue foi coletado em seringas heparinizadas. Em seguida, as amostras foram imediatamente centrifugadas (1000 g por 10 min. a 4°C). O sobrenadante foi novamente centrifugado (14000 g por 15 min. a 24°C) em dispositivos de ultracentrifugação de 10 kDa (Marca Millipore, código UFC503096). Os níveis plasmáticos de nitrato foram obtidos pelo uso do Nitrate/Nitrite Colorimetric Assaykit (Cayman, código 780001) e quantificados seguindo recomendações do kit. Os valores foram expressos em μ M/mL.

4.3.22. Determinação dos níveis de nitrato tecidual

Os níveis teciduais de nitrato foram obtidos pelo uso do Nitrate/Nitrite Colorimetric Assaykit (Cayman, código 780001). A aorta torácica e o leito arterial mesentérico foram coletados e armazenados em criotubos a 80°C. Após eles foram homogeneizados em 200 μ L de tampão PBS (1 μ , pH 7,4), centrifugados (10000 g por 10 min. a 24°C). Foi coletado o sobrenadante dos tecidos e os mesmos foram novamente centrifugados (14000 g por 15 min. a 24°C) em dispositivos de ultracentrifugação de 30 kDa (Marca Millipore, código

UFC503096) e quantificados seguindo recomendações do kit. Os valores foram expressos em $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína.

4.3.23. Estudo funcional da reatividade vascular

Os animais foram anestesiados com Uretana (1,25 g/Kg de peso do animal, i.p.) e posteriormente sacrificados por exsanguinação seguida de rompimento do diafragma. Foi removida a artéria aorta torácica e a mesma foi segmentada em anéis de aproximadamente 0,5 mm. Para os estudos em aorta, dois ganchos de metal foram inseridos no lúmen dos anéis da artéria para produzir tensão de (1,5g). 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). Em seguida, as artérias foram estimuladas com fenilefrina (0,1 $\mu\text{mol}/\text{L}$) até a reprodução da amplitude da resposta contrátil. O endotélio vascular será preservado ou removido mecanicamente de acordo com o protocolo experimental. A integridade do endotélio será testada pelo relaxamento produzido pela acetilcolina (1 $\mu\text{mol}/\text{L}$) sobre contração mantida estimulada com fenilefrina. A reatividade vascular foi estudada a partir da obtenção de curvas concentração-efeito para fenilefrina (0,1nmol/L a 1 $\mu\text{mol}/\text{L}$) em aorta com ou sem endotélio. As curvas para acetilcolina (0,1 nmol/L a 1 $\mu\text{mol}/\text{L}$) e nitroprussiato de sódio (0,1nmol/L a 0,1 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 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 agonista que promove 50% do efeito máximo (EC_{50}), bem como os respectivos efeitos máximos (Emax). Os valores foram expressos em gramas de contração e % de relaxamento.

4.3.24. Reação em cadeia da polimerase em tempo real (RQ-PCR)

A aorta torácica e o leito arterial mesentérico foram rapidamente isolados, transferidos para eppendorfs estéreis e congelados em nitrogênio líquido. Para a extração do RNA, foram adicionados 250 μl de PBS + 750 μl de TRIZOL às amostras, as quais foram lisadas em homogeneizador do tipo Polytron. Em seguida, procedeu-se a extração do RNA total pelo método de Trizol (Invitrogen), conforme orientações do fabricante. A construção do DNA complementar (cDNA) foi realizada por transcrição reversa através da enzima Superscript II.

O cDNA obtido foi submetido à amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real (RT-PCR). Foi utilizado o sistema disponível comercialmente *TaqMan Assay-on-demand*, composto por oligonucleotídeos e sondas (Applied Biosystems) para a análise quantitativa da expressão dos genes selecionados (Tabela 1). A transcrição reversa foi realizada utilizando 1µg de RNA total para cada amostra em 20µL de reação total, com a adição de oligo (dT)₂₀ (Invitrogen, catálogo número 18418-020) e transcriptase reversa Superscript II (Invitrogen, catálogo número 18064-022) de acordo com as instruções do fabricante. O cDNA obtido foi diluído em 1:10 e 2,5µL foi utilizado para cada 15µL da reação de PCR em tempo real usando TaqMan Máster Mix (Applied Biosystems). Todas as reações foram realizadas em duplicata e analisadas no aparelho 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems), e as condições do PCR foram: um ciclo de 10 minutos a 95°C, seguido por 40 ciclos à 94°C de 15 segundos e por um minuto a 60°C. Os dados foram constantemente coletados durante o PCR e analisados em ABI-7500 SDS (software package). O desvio padrão máximo entre as duplicatas foi de no máximo 10%. O RNA total absorvido foi normalizado baseado no valor de Ct para o gene GaPdh (Rn 01775763). A variação de expressão para as amostras foi calculada pelo método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, sendo que a média do delta Ct de um grupo de 8 amostras de ratos controle foram utilizadas como calibrador.

Tabela 1 – Relação das sondas utilizadas na técnica de RT-PCR.

Sonda	Marca	Código
AT ₁	Applied	Rn 01435427_m1
AT ₂	Applied	Rn 00560677_s1
AKT	Applied	Rn 00548382_m1
COX-1	Applied	Rn 01483828_m1
COX2	Applied	Rn 00566881_m1
ECA	Applied	Rn 00561094_m1
ERK1/2	Applied	Rn 00588007_m1
eNOS	Applied	Rn 00583793_m1
GaPdh	Applied	Rn 01775763_g1
iNOS	Applied	Rn 02132634_s1
JNK/SAPK	Applied	Rn 00569058_m1
MAPK38	Applied	Rn 00578842_m1
nNOS	Applied	Rn 00561646_m1

4.3.25. Western Immunoblotting

A aorta torácica e o leito arterial mesentérico foram rapidamente isolados, transferidos para eppendorfs estéreis e congelados em nitrogênio líquido. Quarenta µg de proteína total foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (10% e 7,5%) por 1,2 horas a 100 V 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 1,5 horas 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. A seguir 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 (Marca GE Healthcare Life Sciences do Brasil, código 25006265). Depois de reveladas, as bandas foram submetidas à análise densitométrica óptica. Os resultados foram normalizados pela expressão da β-actina ou pela forma não fosforilada da proteína. Os anticorpos utilizados estão descritos na tabela 2.

Tabela 2 – Relação dos anticorpos utilizados na técnica de Imunoblot.

Anticorpo Primário	Diluição	Marca	Anticorpo Secundário	Diluição
-Anti-Akt total	1:500	Cell Signaling 9272	Rabbit**	1:1000
-anti-Fosfo-Akt (Ser ⁴⁷³)	1:500	Cell Signaling 4058S	Rabbit**	1:1000
-Anti-AT ₁	1:500	Santa Cruz sc-579	Rabbit**	1:1000
-Anti-AT ₂	1:500	Santa Cruz sc-9040	Rabbit**	1:1000
-β-actina	1:5000	Santa Cruz Biotechnology sc-47778	Mouse***	1:5000

-Anti-COX-1	1:1000	Santa Cruz sc-166573	Mouse***	1:5000
-Anti-COX2	1:1000	Cell Signaling 4842S	Mouse***	1:5000
-Anti-ECA	1:500	Santa Cruz sc-12187	Rabbit**	1:1000
-Anti-eNOS	1:1000	Cell Signaling 4058S	Rabbit**	1:1000
-Anti-ERK1/2 total	1:1000	Cell Signaling 9102	Rabbit**	1:1000
-anti-Fosfo-ERK1/2 (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴)	1:1000	Cell Signaling 9101S	Rabbit**	1:1000
-Anti-nNOS	1:500	Cell Signaling 4234S	Rabbit**	1:1000
-Mox1(H-15)	1:1000	Santa Cruz Biotechnology sc-5821	Goat*	1:1000
-anti-p38MAPK total	1:1000	Cell Signaling 9212S	Rabbit**	1:1000
-anti-Fosfo-p38MAPK (Thr¹⁸⁰/Tyr¹⁸²)	1:1000	Cell Signaling 9211S	Rabbit**	1:1000

* Jackson ImmunoResearch cod.305-035-003; **Jackson ImmunoResearch cod.111-035-003; *** Jackson ImmunoResearch cod.115-035-003

4.4. Análise Estatística

Os valores obtidos foram expressos como média \pm E.P.M. do número de animais utilizados em cada experimento. Os resultados foram analisados utilizando o teste t de *Student* ou a Análise de variância de uma via (ANOVA *one-way*), seguidas pelo pós-teste de Newman-Keuls. $P < 0,05$ foi considerado significativo.



Fonte: Autor desconhecido.

5. RESULTADOS

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

O tratamento com etanol reduziu gradativamente o ganho de peso dos animais quando comparado ao grupo controle. A perda de peso foi prevenida pelo tratamento com o losartan (Figura 2).

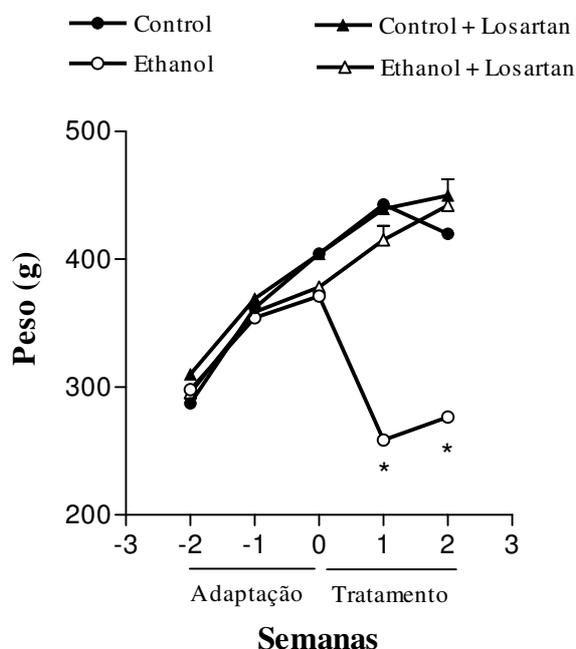


Figura 2. Efeito do consumo crônico de etanol sobre a evolução temporal do peso dos animais. Os pontos representam as aferições semanais do peso, em gramas, de animais do grupo controle, etanol, controle tratado com losartan (10 mg/kg via oral) ou etanol tratado com losartan. Os valores representam a média \pm E.P.M. (n = 30 animais). *Diferença em relação ao grupo controle, controle+losartan e etanol + losartan ($p < 0,05$, ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls).

5.2. Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a evolução temporal do consumo de ração pelos animais

O tratamento com etanol reduziu gradativamente o consumo de ração pelos animais quando comparado ao grupo controle. A redução no consumo de ração foi prevenida pelo tratamento com o losartan (Figura 3).

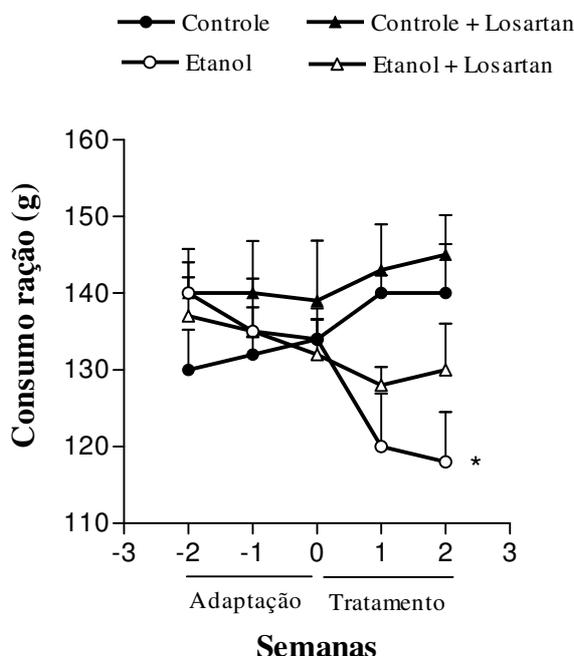


Figura 3. Efeito do consumo crônico de etanol sobre a evolução temporal do consumo de ração pelos animais. Os pontos representam as aferições semanais do consumo de ração, em gramas, de animais do grupo controle, etanol, controle tratado com losartan (10 mg/kg via oral) ou etanol tratado com losartan. Os valores representam a média \pm E.P.M. (n = 30 animais). *Diferença em relação ao grupo controle, controle+losartan e etanol + losartan ($p < 0,05$, ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls).

5.3. Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a evolução temporal da ingestão de líquido pelos animais

Os animais tratados cronicamente com etanol tiveram uma redução gradativa de sua ingestão de líquido, principalmente durante as duas semanas de tratamento, quando comparado a ingestão de água pelos animais do grupo controle. O tratamento com losartan preveniu a redução da ingestão de líquidos (Figura 4).

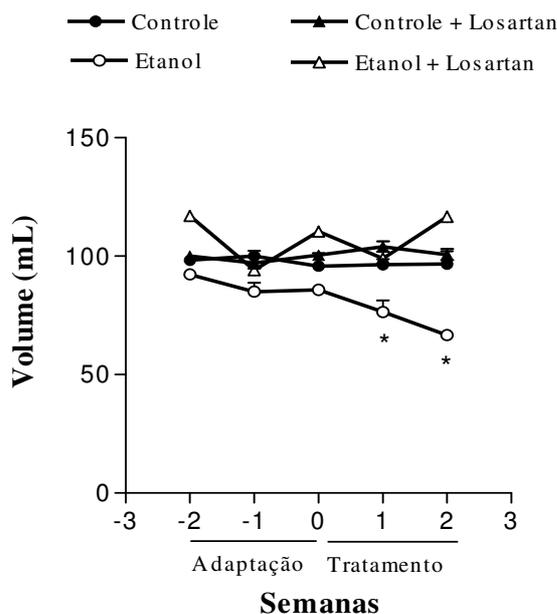


Figura 4. Efeito do consumo crônico de etanol sobre a evolução temporal da ingestão de líquido pelos animais. Os pontos representam as aferições semanais da ingestão de líquido, em mL, de animais do grupo controle, etanol, controle tratado com losartan (10 mg/kg via oral) ou etanol tratado com losartan. Os valores representam a média \pm E.P.M. (n = 30 animais). *Diferença em relação ao grupo controle, controle+losartan e etanol + losartan ($p < 0,05$, ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls).

5.4. Avaliação dos níveis sanguíneos de etanol no modelo experimental de consumo crônico de etanol

No modelo experimental de consumo crônico foi observado uma maior concentração plasmática de etanol nos animais do grupo etanol em relação aos do grupo etanol tratados com losartan (Figura 5).

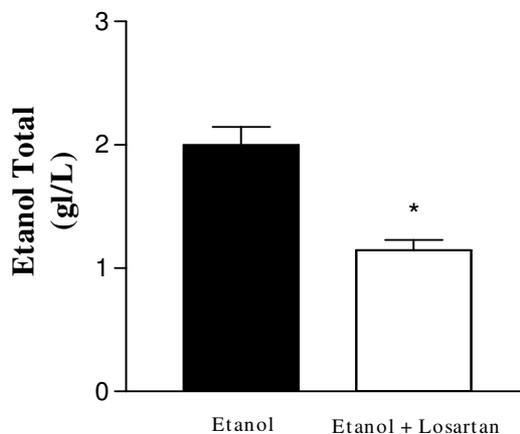


Figura 5. Avaliação dos níveis sanguíneos de etanol no modelo experimental de consumo crônico de etanol. As barras representam as dosagens sanguíneas do etanol de animais do grupo etanol ou etanol tratado com losartan (10 mg/kg via oral). Os valores representam a média \pm E.P.M. (n = 8 animais). *Diferença em relação ao grupo etanol ($p < 0,05$, teste *t* de Student).

5.5. Efeito do tratamento crônico com etanol sobre os valores de pressão arterial e frequência cardíaca dos animais

O consumo crônico de etanol promoveu aumento significativo dos valores da pressão arterial sistólica e diastólica durante as semanas, porém não afetou os valores de frequência cardíaca em relação aos valores obtidos nos animais do grupo controle. O tratamento com o losartan preveniu o aumento das pressões sistólica, diastólica e média (Figura 6).

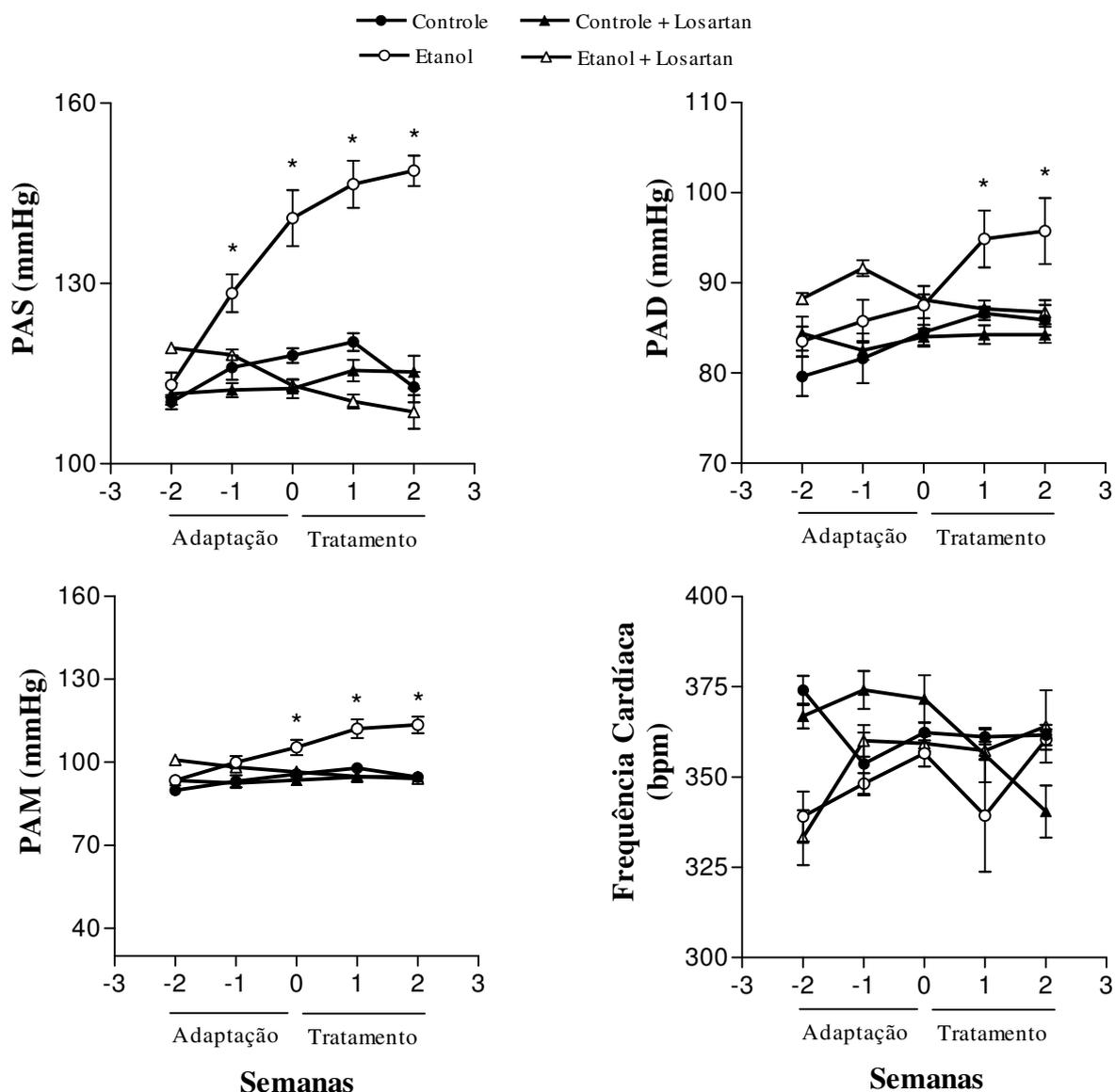


Figura 6. Efeito do consumo crônico de etanol sobre os valores de pressão arterial e frequência cardíaca dos animais. Os pontos representam as médias dos valores, aferidos semanalmente, da pressão arterial sistólica, diastólica, média e frequência cardíaca, em mmHg e bpm respectivamente, de animais do grupo controle, etanol, controle tratado com losartan (10 mg/kg via oral) ou etanol tratado com losartan. Os valores representam \pm E.P.M. (n = 8 animais). *Diferença em relação ao grupo controle, controle+losartan e etanol + losartan ($p < 0,05$, ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls).

5.6. Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a atividade plasmática da renina

O tratamento com etanol induziu aumento da atividade plasmática da renina quando comparada ao grupo controle. Resultado semelhante foi observado em ratos tratados com o losartan (Figura 7).

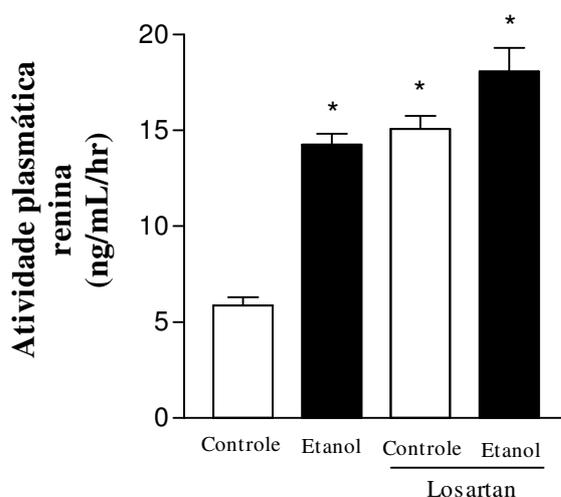


Figura 7. Efeito do consumo crônico de etanol sobre a atividade plasmática da renina em ratos. As barras representam as dosagens do plasma de animais do grupo controle, etanol, controle tratado com losartan (10 mg/kg via oral) ou etanol tratado com losartan. Os valores representam a média \pm E.P.M. (n = 6-9 animais). *Diferença em relação ao grupo controle ($p < 0,05$, ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls).

5.7. Efeito do consumo crônico de etanol sobre os níveis plasmáticos de ANG I e ANG II

O consumo de etanol induziu aumento nos níveis plasmáticos de ANG I. O tratamento com o losartan não preveniu o aumento plasmático da ANG I induzido pelo etanol (Figura 8). Houve aumento dos níveis plasmáticos de ANG II após tratamento com etanol. O tratamento com losartan não alterou os níveis plasmáticos de ANG II e não preveniu o aumento plasmático de ANG II induzido pelo consumo de etanol (Figura 8).

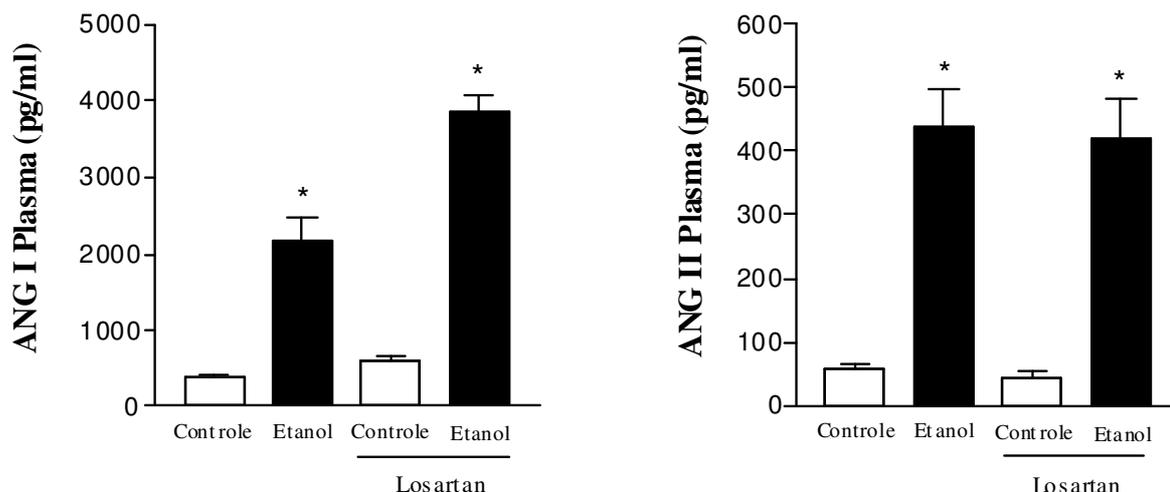
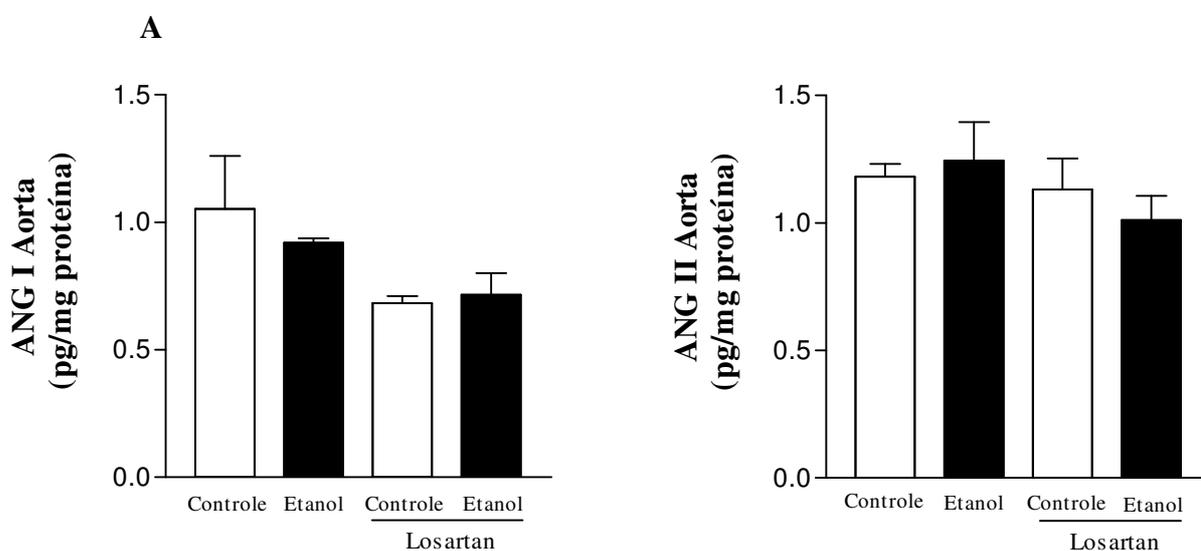


Figura 8. Efeito do consumo crônico de etanol sobre os níveis plasmáticos de ANG I e ANG II em ratos. As barras representam as dosagens do plasma de animais do grupo controle, etanol, controle tratado com losartan (10 mg/kg via oral) ou etanol tratado com losartan. Os valores representam a média \pm E.P.M. (n = 6-13 animais). *Diferença em relação ao grupo controle e controle+losartan ($p < 0,05$, ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls).

5.8. Efeito do consumo crônico de etanol sobre os níveis teciduais de ANG I e ANG II

Os níveis teciduais de ANG I e ANG II foram avaliados em aorta e leito arterial mesentérico de ratos. O consumo crônico do etanol não alterou os níveis de ANG I ou ANG II em aorta ou leito arterial mesentérico de ratos (Figura 9). Resultado semelhante foi observado nos animais tratados com losartan.



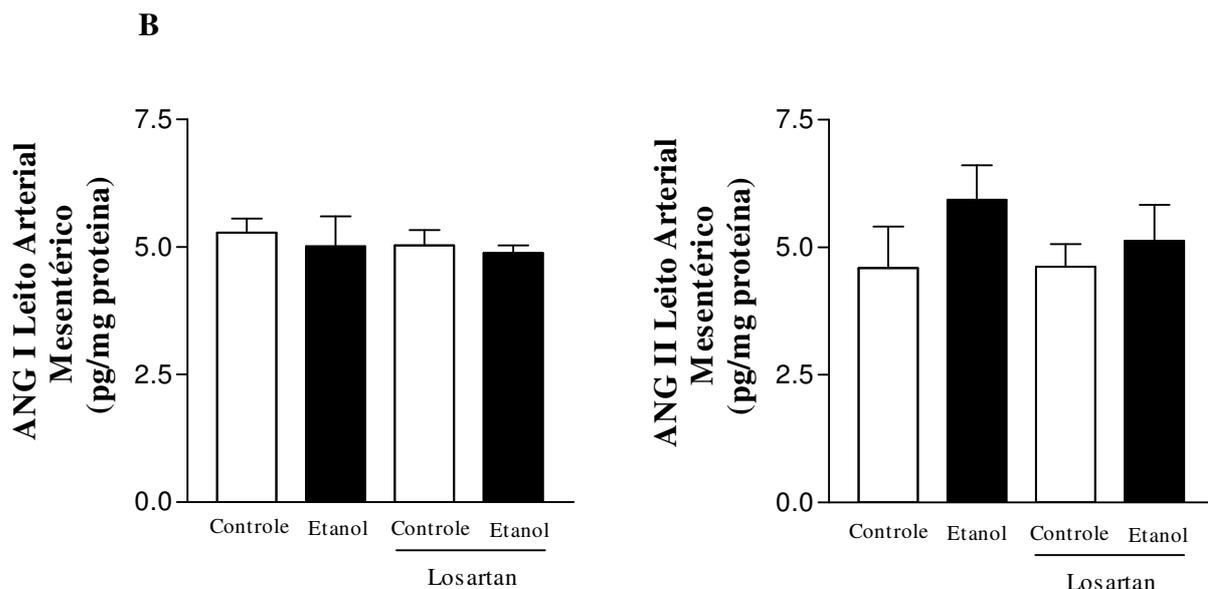
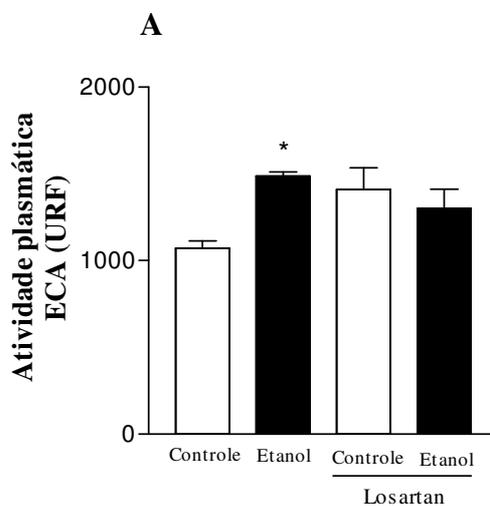


Figura 9. Efeito do consumo crônico de etanol sobre os níveis de ANG I e ANG II em aorta e leito arterial mesentérico de ratos. As barras representam as dosagens do homogenato de anéis de artéria aorta torácica (A) e leito mesentérico (B) de animais do grupo controle, etanol, controle+losartan (10 mg/kg via oral) ou etanol tratado com losartan. Os valores representam a média \pm E.P.M. (n = 8-14 animais).

5.9. Efeito do consumo crônico de etanol sobre a atividade plasmática e tecidual da Enzima Conversora de Angiotensina

O tratamento crônico com etanol induziu aumento da atividade plasmática da ECA quando comparada ao grupo controle. Resultado semelhante foi observado em ratos tratados com o losartan (Figura 10 A). O consumo crônico do etanol não alterou a atividade da ECA em aorta ou leito arterial mesentérico de ratos (Figuras 10 B e C).



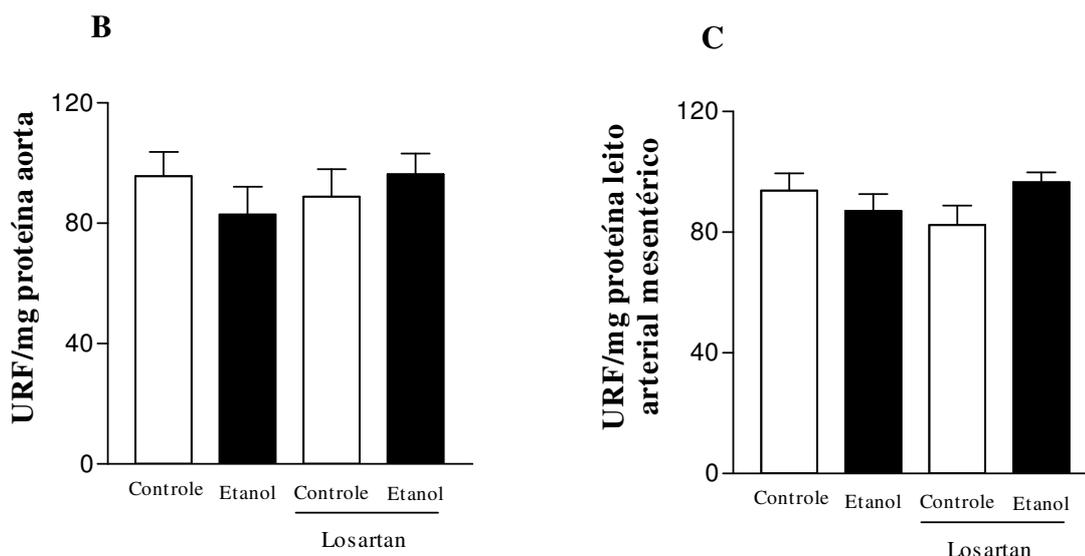


Figura 10. Efeito do consumo crônico de etanol sobre a atividade plasmática e tecidual da ECA em ratos. As barras representam as dosagens do plasma (A) e do homogenato de anéis de artéria aorta torácica (B) e leito arterial mesentérico (C) de animais do grupo controle, etanol, controle+losartan (10 mg/kg via oral) ou etanol tratado com losartan. Os valores representam a média \pm E.P.M. (n = 7 - 8 animais). *Diferença em relação ao grupo controle, controle + losartan e etanol + losartan ($p < 0,05$, ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls).

5.10. Efeito do consumo crônico de etanol sobre os níveis plasmáticos de aldosterona

O consumo crônico de etanol não afetou os níveis plasmáticos da aldosterona. Os resultados obtidos foram semelhantes para todos os grupos experimentais, conforme observado na Figura 11.

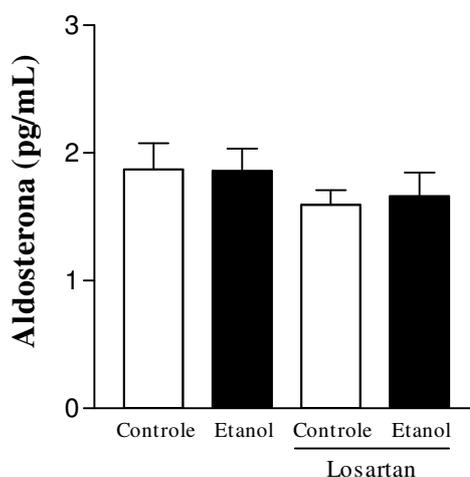


Figura 11. Efeito do consumo crônico de etanol sobre os níveis plasmáticos de aldosterona em ratos. As barras representam as dosagens do plasma de animais do grupo controle, etanol, controle tratado com losartan (10 mg/kg via oral) ou etanol tratado com losartan. Os valores representam a média \pm E.P.M. (n = 5 - 6 animais).

5.11. Efeito do consumo crônico de etanol sobre a osmolaridade e sódio plasmático de ratos

Ao avaliar os níveis de osmolaridade plasmática não observamos alteração dos valores com o tratamento crônico com etanol em relação aos valores dos animais do grupo controle. O tratamento com o losartan também não afetou a osmolaridade (Figura 12 A). O tratamento com etanol ou losartan não afetou os níveis plasmáticos de sódio (Figura 12 B).

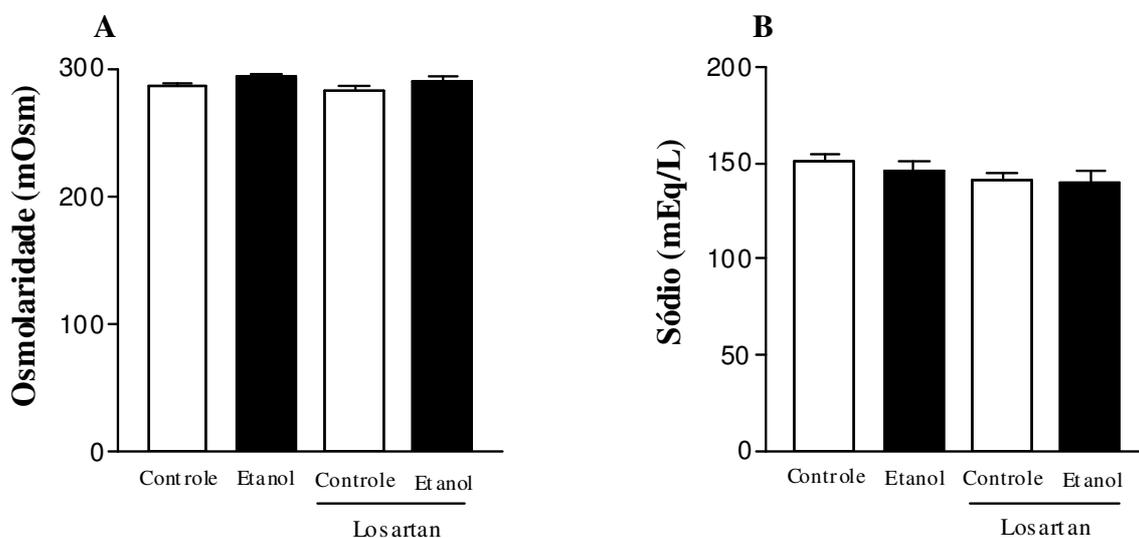


Figura 12. Efeito do consumo crônico de etanol sobre a osmolaridade e os níveis de sódio plasmático em ratos. A osmolaridade e o sódio plasmático foram determinados em animais dos grupos controle, etanol, controle tratado com losartan (10 mg/kg via oral) e etanol tratado com losartan (10 mg/kg via oral). Os valores representam a média \pm E.P.M. (n = 8 - 9 animais).

5.12. Efeito do consumo crônico de etanol sobre os níveis plasmáticos de peptídeo natriurético atrial (ANP), vasopressina (AVP) e ocitocina (OT)

O tratamento com etanol induziu aumento significativo dos níveis plasmáticos de ANP e o losartan não foi capaz de prevenir essa resposta (Figura 13 A). O tratamento crônico de etanol reduziu significativamente os níveis plasmáticos de vasopressina. O tratamento com losartan não foi capaz de prevenir essa resposta (Figura 13 B). De forma semelhante, o consumo crônico de etanol induziu a redução dos níveis plasmáticos de OT e o losartan não foi capaz de prevenir essa resposta (Figura 13 C).

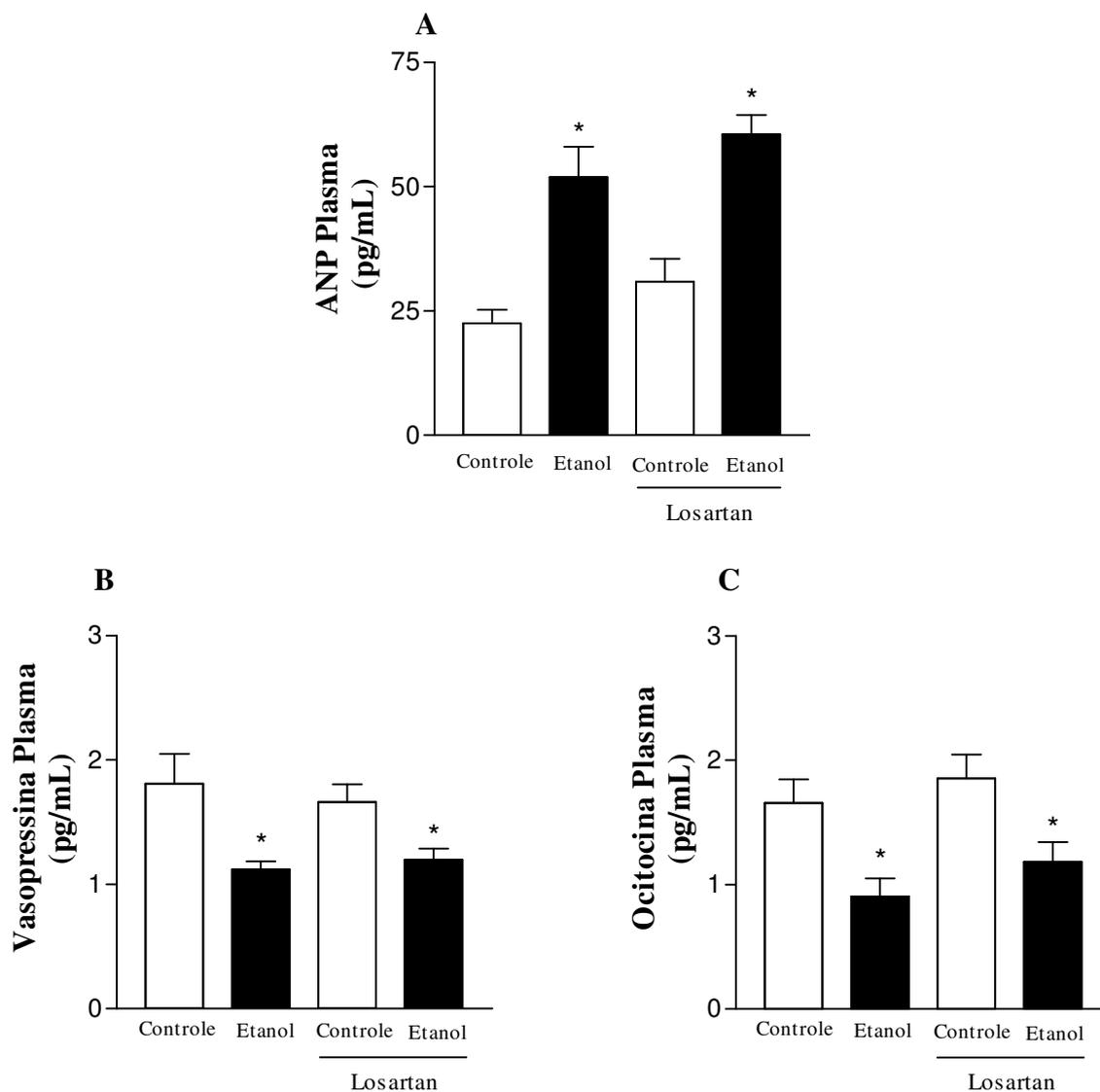


Figura 13. Efeito do consumo crônico de etanol sob os níveis plasmáticos de ANP, AVP e OT. O hormônio foi avaliado no plasma de animais dos grupos controle, etanol, controle tratado com losartan (10 mg/kg via oral) e etanol tratado com losartan (10 mg/kg via oral). Os valores representam a média \pm E.P.M. (n = 7 - 9 animais). * Diferença em relação ao grupo controle e controle + losartan ($p < 0,05$; ANOVA seguida pelo pós-teste de Newman-Keuls).

5.13. Efeito do consumo crônico de etanol sobre os níveis plasmáticos de corticosterona

O consumo crônico de etanol induziu aumento dos níveis plasmáticos de corticosterona. O tratamento com losartan não preveniu este aumento induzido pelo tratamento com etanol (Figura 14).

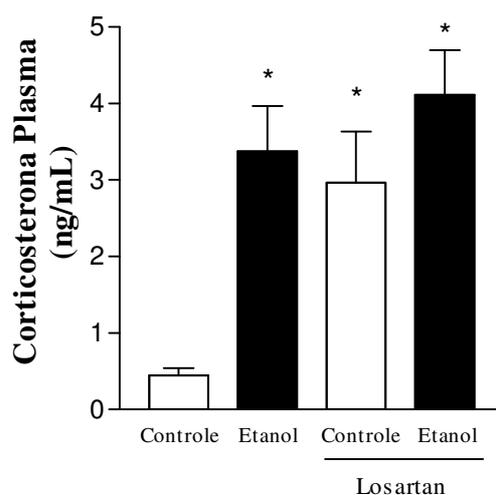


Figura 14. Efeito do consumo crônico de etanol sob os níveis plasmáticos de Corticosterona. Os hormônios foram avaliados no plasma de animais dos grupos controle, etanol, controle tratado com losartan (10 mg/kg via oral) e etanol tratado com losartan (10 mg/kg via oral). Os valores representam a média \pm E.P.M. (n = 7 - 9 animais). *Diferença em relação ao grupo controle ($p < 0,05$; ANOVA seguida pelo pós-teste de Newman-Keuls).

5.14. Efeito do consumo crônico de etanol sobre espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no plasma de ratos

O consumo crônico de etanol induziu aumento dos níveis de TBARS. O tratamento com losartan preveniu o aumento dos níveis de TBARS induzido pelo tratamento com etanol (Figura 15).

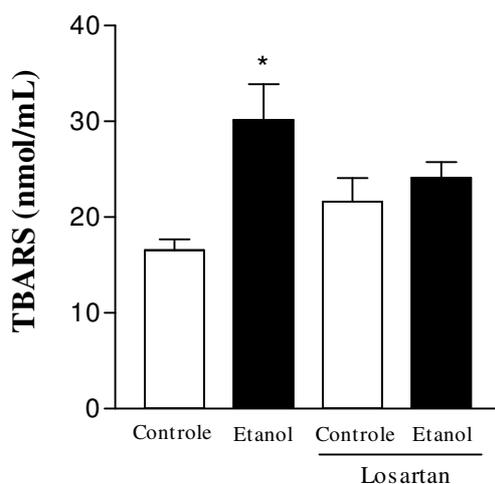


Figura 15. Efeito do consumo crônico de etanol sobre os níveis das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no plasma de ratos. As barras representam as dosagens do plasma de animais do grupo controle, etanol, controle tratado com losartan (10 mg/kg via oral) ou etanol tratado com losartan. Os valores representam a média \pm E.P.M. (n = 8-9 animais). *Diferença em relação ao grupo controle, controle + losartan e etanol + losartan ($p < 0,05$, ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls).

5.15. Efeito do consumo crônico de etanol sobre produção O_2^- em aorta e leito arterial mesentérico de ratos

O O_2^- derivado da NAD(P)H oxidase foi mensurado nos grupos experimentais e observou-se que o consumo crônico de etanol aumentou os níveis de O_2^- na aorta e no leito mesentérico (Figura 16). O tratamento com losartan foi capaz de prevenir o aumento na produção de O_2^- (figura 16).

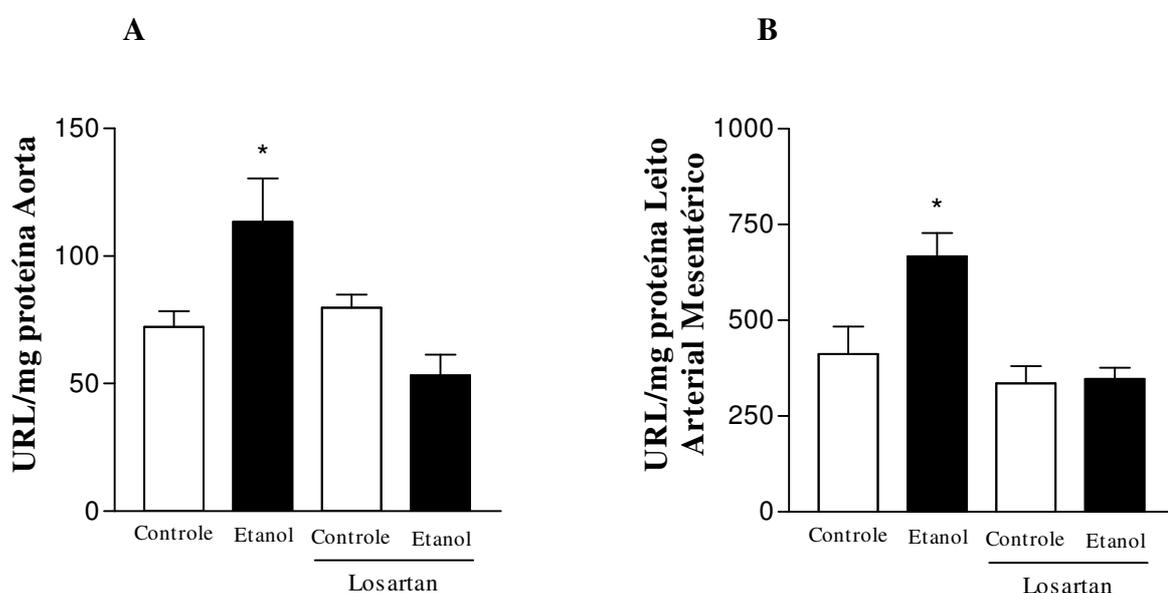


Figura 16. Produção de O_2^- derivado da NAD(P)H oxidase em aorta (A) e leito arterial mesentérico (B) de ratos. As barras representam as dosagens do homogenato de anéis de artéria aorta torácica e leito mesentérico de animais do grupo controle, etanol, controle tratado com losartan (10 mg/kg via oral) ou etanol tratado com losartan. Os valores representam a média \pm E.P.M. (n = 8 animais). *Diferença em relação ao grupo controle, controle + losartan e etanol + losartan ($p < 0,05$, ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls).

5.16. Efeito do consumo crônico de etanol sobre a atividade da superóxido dismutase (SOD) no plasma de ratos

Não foram constatadas diferenças estatisticamente significativas da atividade da SOD entre os grupos experimentais (Figura 17).

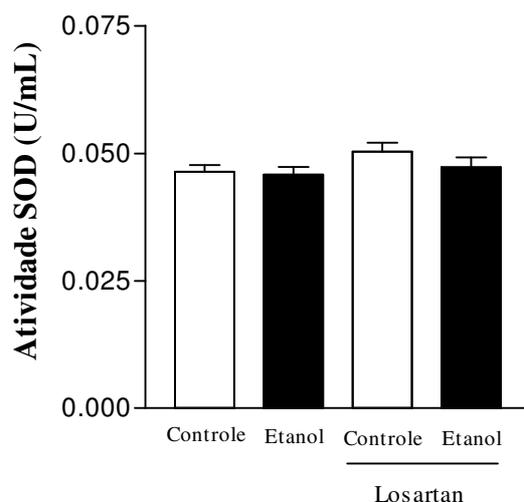


Figura 17. Efeito do consumo crônico de etanol sobre a atividade da SOD no plasma de ratos. As barras representam as dosagens do plasma de animais do grupo controle, etanol, controle tratado com losartan (10 mg/kg via oral) ou etanol tratado com losartan. Os valores representam a média \pm E.P.M. (n = 7-8 animais).

5.17. Efeito do consumo crônico de etanol sobre os níveis de H_2O_2 no plasma de ratos

O consumo crônico de etanol não afetou os níveis plasmáticos de H_2O_2 . Os resultados obtidos foram semelhantes para todos os grupos experimentais, conforme observado na Figura 18.

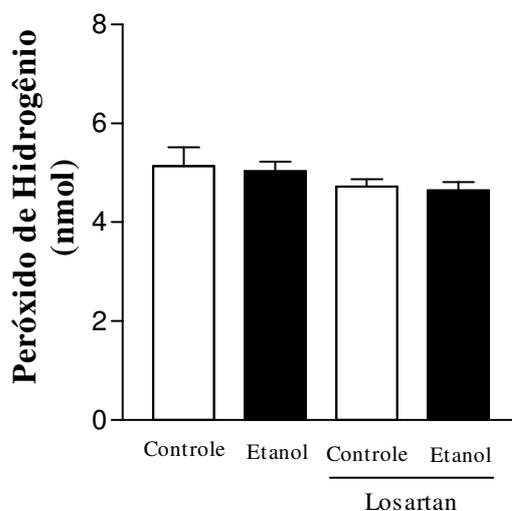


Figura 18. Efeito do consumo crônico de etanol sobre os níveis de H_2O_2 no plasma de ratos. As barras representam as dosagens do plasma de animais do grupo controle, etanol, controle tratado com losartan (10 mg/kg via oral) ou etanol tratado com losartan. Os valores representam a média \pm E.P.M. (n = 7-8 animais).

5.18. Efeito do consumo crônico de etanol sobre a atividade antioxidante total no plasma de ratos

Constatou-se o aumento na capacidade antioxidante total nos animais do grupo etanol quando comparados aos animais controles. O tratamento com losartan foi capaz de prevenir tal efeito induzido pelo etanol (Figura 19).

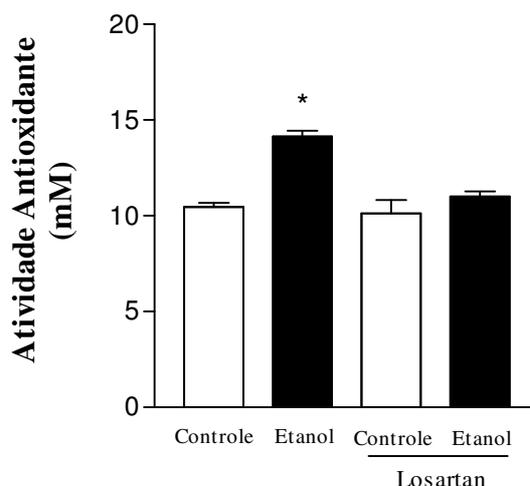


Figura 19. Efeito do consumo crônico de etanol sobre a atividade antioxidante no plasma de ratos. As barras representam as dosagens do plasma de animais do grupo controle, etanol, controle tratado com losartan (10 mg/kg via oral) ou etanol tratado com losartan. Os valores representam a média \pm E.P.M. (n = 7-9 animais). *Diferença em relação ao grupo controle, controle + losartan e etanol + losartan ($p < 0,05$, ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls).

5.19. Efeito do consumo crônico de etanol sobre os níveis de nitrato plasmático e tecidual

Houve redução dos níveis plasmáticos de nitrato em animais tratados cronicamente com etanol e o tratamento com losartan preveniu essa resposta (Figura 20 A).

O consumo crônico de etanol foi capaz de reduzir significativamente os níveis de nitrato/nitrito (Nox) tanto em homogenatos de aorta torácica quanto em leito arterial mesentérico de ratos. O tratamento com losartan foi capaz de prevenir a queda destes níveis, conforme pode ser observado na Figura 20 (B e C).

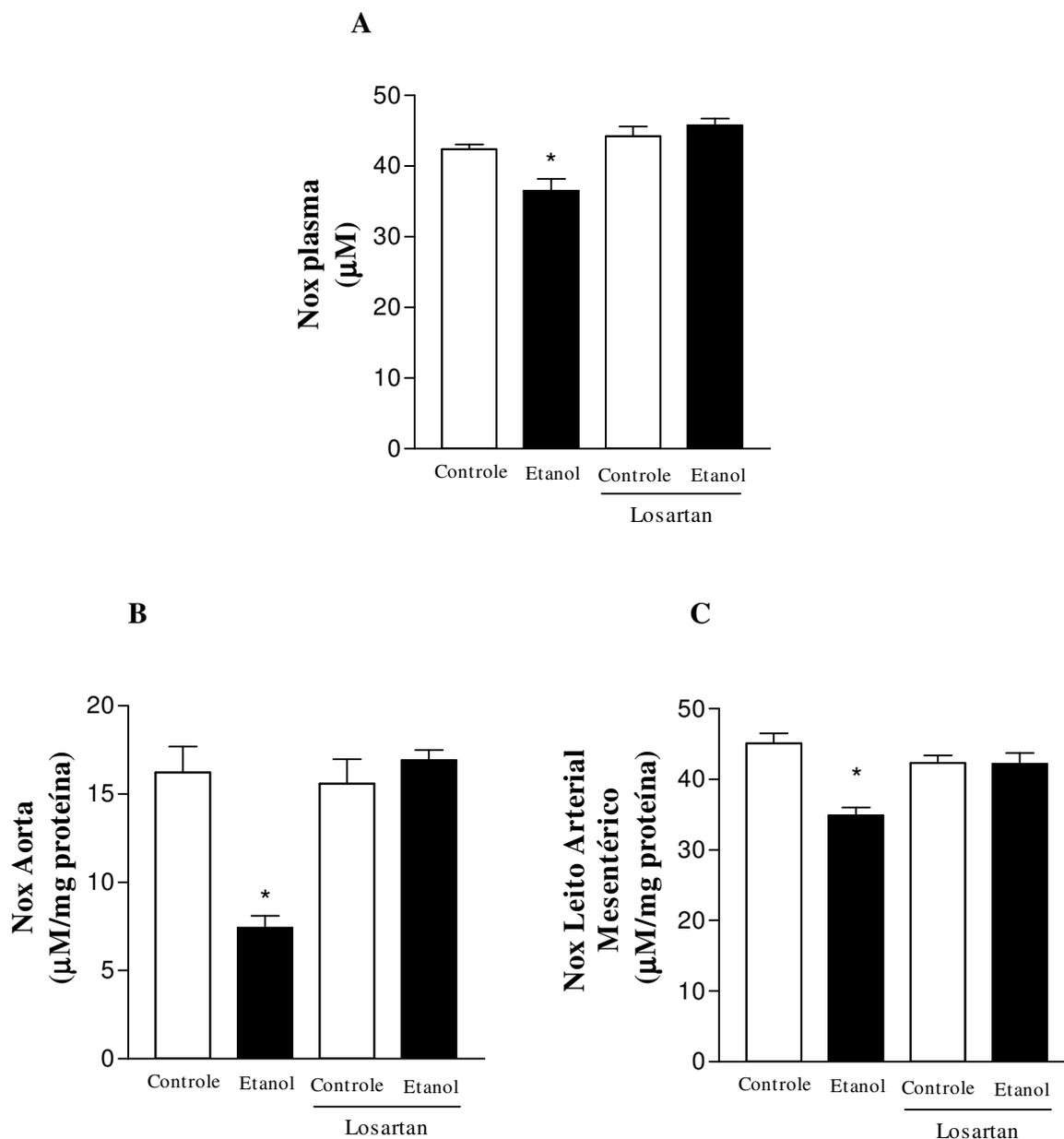


Figura 20. Efeito do consumo crônico de etanol sobre os níveis de Nitrato plasmático e tecidual de ratos. As barras representam as dosagens do plasma (A) e do homogenato de anéis de artéria aorta torácica (B) e leito arterial mesentérico (C) de animais do grupo controle, etanol, controle tratado com losartan (10 mg/kg via oral) ou etanol tratado com losartan. Os valores representam a média \pm E.P.M. ($n = 7 - 8$ animais). *Diferença em relação ao grupo controle, controle + losartan e etanol + losartan ($p < 0,05$, ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls).

5.20. Efeito do consumo de etanol sobre a reatividade vascular

Não houve alteração na resposta de relaxamento à acetilcolina entre os grupos experimentais (Figura 21; Tabela 3).

Tabela 3 - Efeito do consumo de etanol sobre os valores de E_{max} (% relaxamento) e pD_2 da acetilcolina em anéis de aorta com endotélio.

Acetilcolina	Com Endotélio	
	E_{max}	pD_2
Controle	93,92 ± 8,69 (5)	7,13 ± 0,11
Controle + Losartan	95,43 ± 2,56 (5)	7,47 ± 0,29
Etanol	80,67 ± 10,43 (6)	7,55 ± 0,43
Etanol + Losartan	96,64 ± 3,95 (6)	7,02 ± 0,29

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

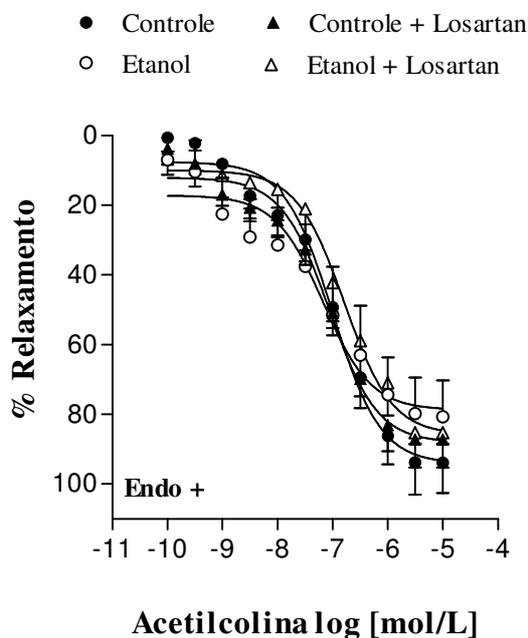


Figura 21. Efeito do consumo crônico de etanol no relaxamento induzido pela acetilcolina em anéis de artéria aorta torácica de ratos. As curvas dose-resposta foram determinadas em anéis com endotélio de animais do grupo controle, etanol, controle tratado com losartan (10 mg/kg via oral) ou etanol tratado com losartan. Os valores representam a média ± E.P.M. (n = 5-6 animais).

O consumo crônico de etanol não afetou a resposta de relaxamento independente do endotélio induzida pelo NPS nos anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina (Figura 22; Tabela 4).

Tabela 4 - Efeito da angiotensina II sobre os valores de E_{max} (% relaxamento) e pD_2 da Nitroprussiato de Sódio em anéis de aorta com endotélio de ratos tratados cronicamente com etanol.

Nitroprussiato de Sódio	Sem Endotélio	
	E_{max}	pD_2
Controle	119,62 ± 2,24 (12)	7,42 ± 0,63
Controle + Losartan	131,58 ± 8,97 (8)	7,14 ± 0,07
Etanol	126,78 ± 4,45 (6)	7,46 ± 0,11
Etanol + Losartan	118,23 ± 11,81 (6)	6,87 ± 0,16

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

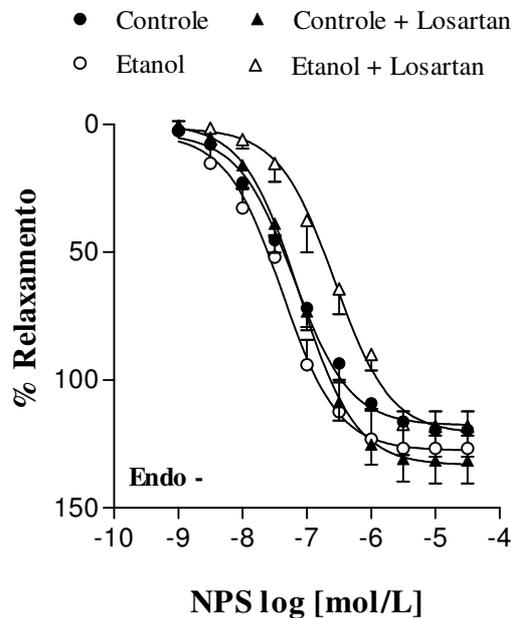


Figura 22. Efeito do consumo crônico de etanol no relaxamento induzido pelo NPS em anéis de artéria aorta torácica de ratos. As curvas dose-resposta foram determinadas em anéis sem endotélio de animais do grupo controle, etanol, controle tratado com losartan (10 mg/kg via oral) ou etanol tratado com losartan. Os valores representam a média ± E.P.M. (n = 6-12 animais).

Nos experimentos realizados em anéis de artéria torácica de ratos verificou-se que o tratamento crônico de etanol promoveu aumento da resposta de contração à fenilefrina em anéis de aorta torácica com e sem endotélio em relação ao grupo controle (Figura 23, Tabela 5). O tratamento com losartan preveniu o aumento da contração à fenilefrina induzido pelo tratamento com etanol.

Tabela 5 - Efeito da angiotensina II sobre os valores de E_{max} (g) e pD_2 da fenilefrina em anéis de aorta com ou sem endotélio de ratos tratados cronicamente com etanol.

Fenilefrina	Com Endotélio		Sem Endotélio	
	E_{max}	pD_2	E_{max}	pD_2
Controle	1,21 ± 0,11 (6)	7,02 ± 0,15	1,54 ± 0,10 (8)	7,26 ± 0,25
Controle + Losartan	1,13 ± 0,04 (6)	6,97 ± 0,11	1,44 ± 0,18 (7)	7,69 ± 0,33
Etanol	1,51 ± 0,04 (6) ^a	7,50 ± 0,17	2,37 ± 0,10 (8) ^a	7,20 ± 0,05
Etanol + Losartan	1,34 ± 0,04 (6)	6,91 ± 0,16	1,68 ± 0,27 (7)	7,45 ± 0,20

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

^a Diferença em relação ao grupo controle, controle+losartan e etanol+losartan ($p < 0,05$, ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls).

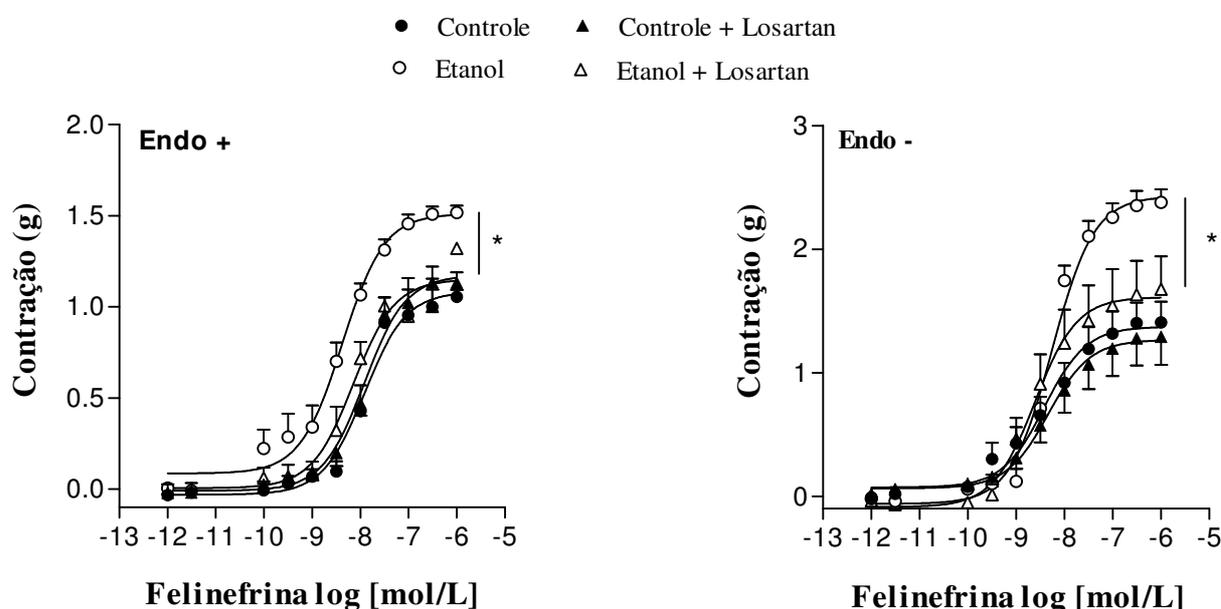


Figura 23. Efeito do consumo crônico de etanol na contração induzida pela fenilefrina em anéis de aorta com e sem endotélio. As curvas dose-resposta foram determinadas em anéis sem endotélio de animais do grupo controle, etanol, controle tratado com losartan (10 mg/kg via oral) ou etanol tratado com losartan. Os valores representam a média ± E.P.M. ($n = 7-9$ animais). *Diferença em relação ao grupo controle, controle + losartan e etanol + losartan ($p < 0,05$, ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls).

5.21. Efeito do consumo crônico de etanol sobre a expressão gênica

O tratamento crônico de etanol não foi capaz de alterar a expressão gênica da MAPK p38 em homogenato de artéria aorta torácica. Entretanto, houve aumento significativo da expressão gênica para a MAPK p38 em homogenato de leito arterial mesentérico nos animais

tratados cronicamente com etanol. O tratamento com o losartan foi capaz de prevenir tal aumento na expressão gênica, conforme observado na Figura 24.

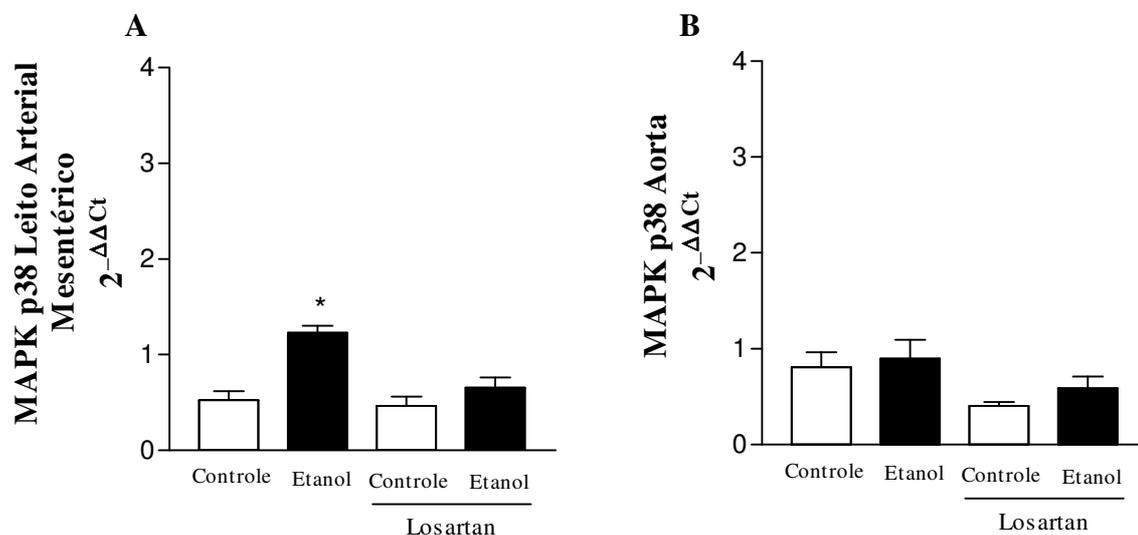


Figura 24. Efeito do consumo crônico de etanol sobre a expressão gênica da MAPK p38 de ratos. As barras representam as dosagens do homogenato de anéis de artéria aorta torácica (A) e leito arterial mesentérico (B) de animais do grupo controle, etanol, controle tratado com losartan (10 mg/kg via oral) ou etanol tratado com losartan. Os valores representam a média \pm E.P.M. (n = 8 - 10 animais). *Diferença em relação ao grupo controle, controle + losartan e etanol + losartan (p<0,05, ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls).

O tratamento crônico com etanol foi capaz de induzir o aumento na expressão gênica da MAPK JNK/SAPK, tanto em amostras de homogenato de artéria aorta torácica e leito arterial mesentérico. O tratamento com losartan preveniu tais efeitos (Figura 25).

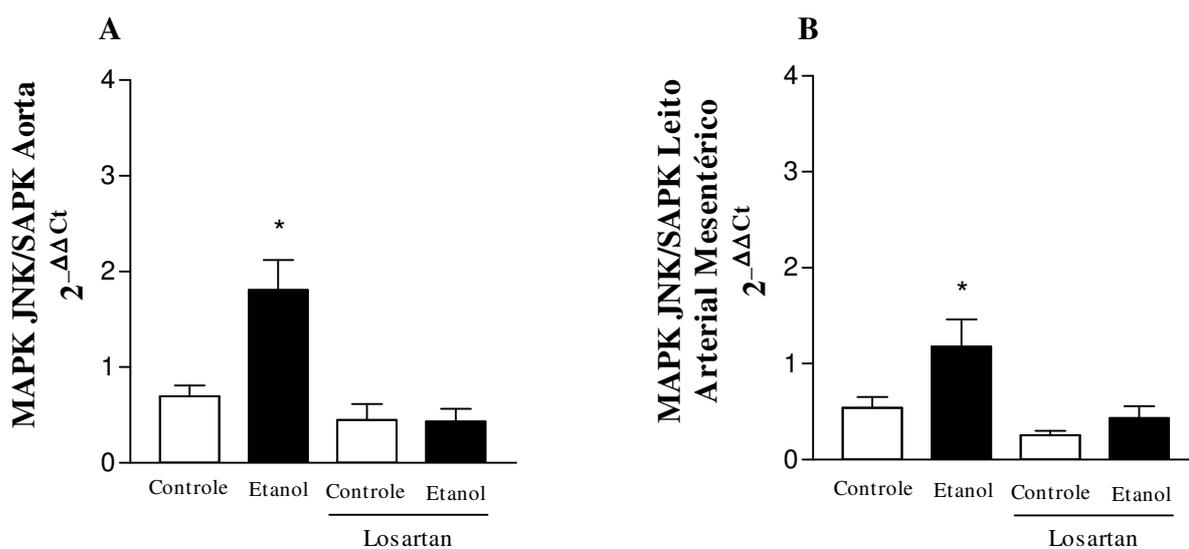


Figura 25. Efeito do consumo crônico de etanol sobre a expressão gênica da JNK/SAPK de ratos. As barras representam as dosagens do homogenato de anéis de artéria aorta torácica (A) e leito arterial mesentérico (B) de animais do grupo controle, etanol, controle tratado com losartan (10 mg/kg via oral) ou etanol tratado com losartan. Os valores representam a média \pm E.P.M. (n = 8 - 10 animais). *Diferença em relação ao grupo controle, controle + losartan e etanol + losartan (p<0,05, ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls).

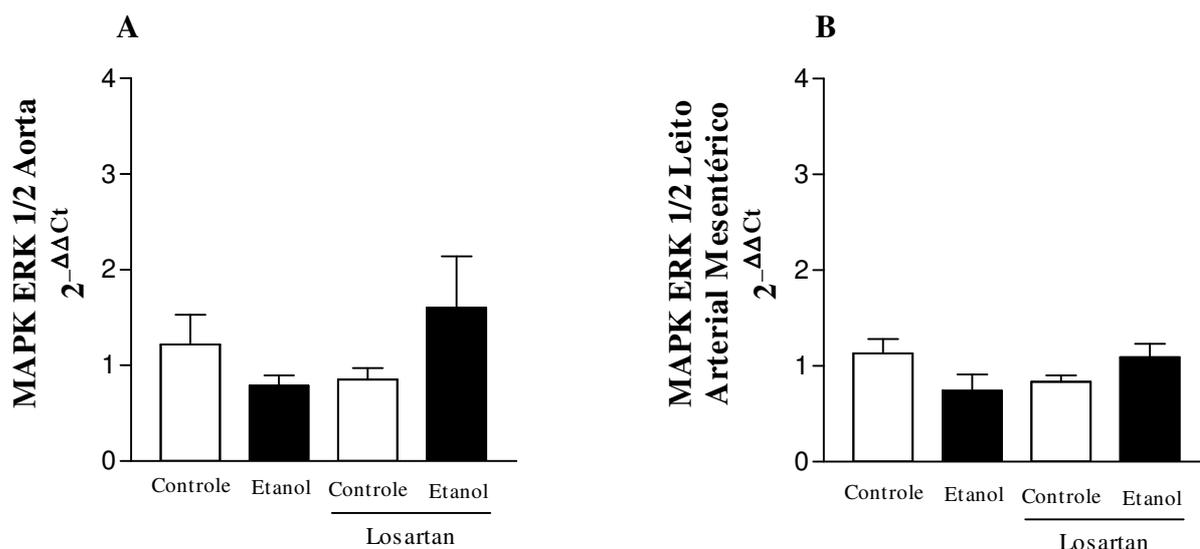


Figura 26. Efeito do consumo crônico de etanol sobre a expressão gênica da MAPK ERK 1/2 de ratos. As barras representam as dosagens do homogenato de anéis de artéria aorta torácica (A) e leito arterial mesentérico (B) de animais do grupo controle, etanol, controle tratado com losartan (10 mg/kg via oral) ou etanol tratado com losartan. Os valores representam a média \pm E.P.M. (n = 8 - 10 animais).

Os animais tratados cronicamente com etanol não demonstraram alteração na expressão gênica para o receptor AT_1 na aorta torácica ou leito arterial mesentérico (Figura 27).

Em relação ao receptor AT_2 , constatou-se aumento significativo de sua expressão gênica nos animais tratados cronicamente com losartan na presença ou ausência do etanol no leito arterial mesentérico (Figura 28 B). Porém, não foi observada nenhuma alteração da expressão gênica para o receptor AT_2 nas amostras de artéria aorta torácica, como demonstrado na Figura 28 (A).

As amostras de artéria aorta torácica dos ratos tratados cronicamente com etanol demonstraram aumento na expressão gênica para o gene da ECA. O tratamento com o losartan preveniu o aumento da expressão deste gene induzido pelo etanol (Figura 29 A).

Não houve alteração da expressão gênica da ECA para as amostras de leito arterial mesentérico de ratos tratados cronicamente com etanol (Figura 29 B).

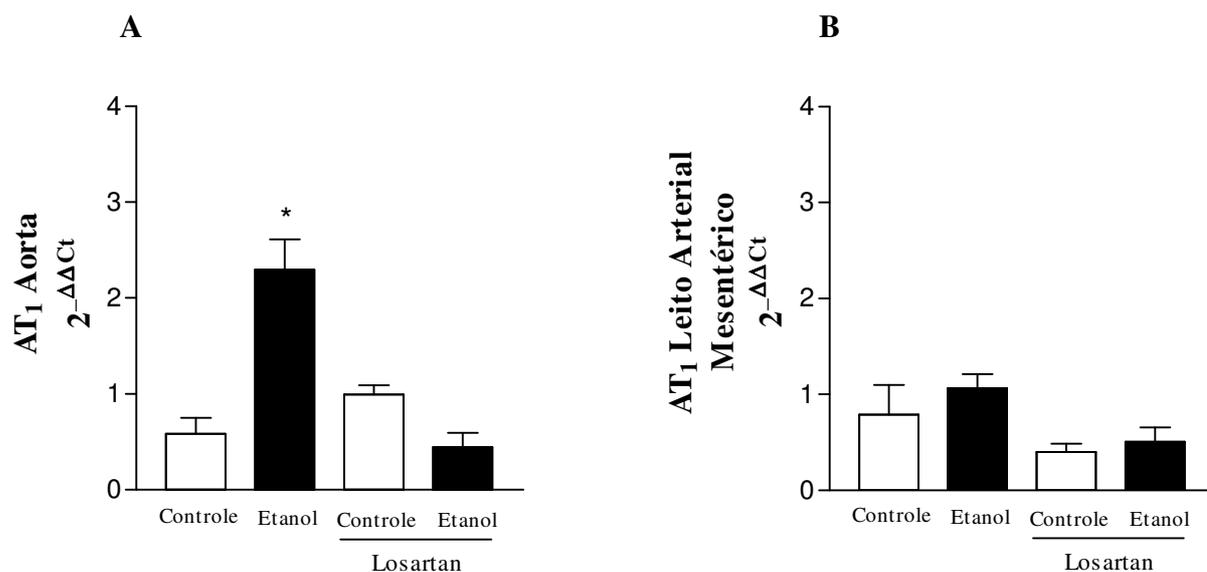


Figura 27. Efeito do consumo crônico de etanol sobre a expressão gênica do receptor AT₁ de ratos. As barras representam as dosagens do homogenato de anéis de artéria aorta torácica (A) e leito arterial mesentérico (B) de animais do grupo controle, etanol, controle tratado com losartan (10 mg/kg via oral) ou etanol tratado com losartan. Os valores representam a média ± E.P.M. (n = 8 - 10 animais). *Diferença em relação ao grupo controle, controle + losartan e etanol + losartan (p<0,05, ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls).

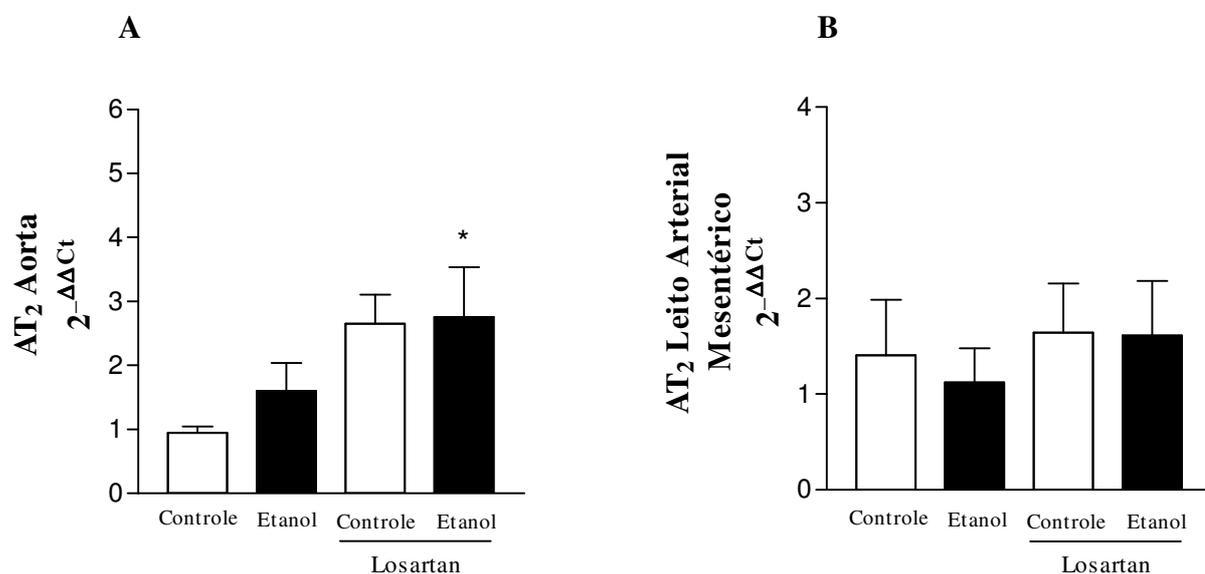


Figura 28. Efeito do consumo crônico de etanol sobre a expressão gênica do receptor AT₂ de ratos. As barras representam as dosagens do homogenato de anéis de artéria aorta torácica (A) e leito arterial mesentérico (B) de animais do grupo controle, etanol, controle tratado com losartan (10 mg/kg via oral) ou etanol tratado com losartan. Os valores representam a média ± E.P.M. (n = 8 - 10 animais). *Diferença em relação ao grupo controle e etanol (p<0,05, ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls).

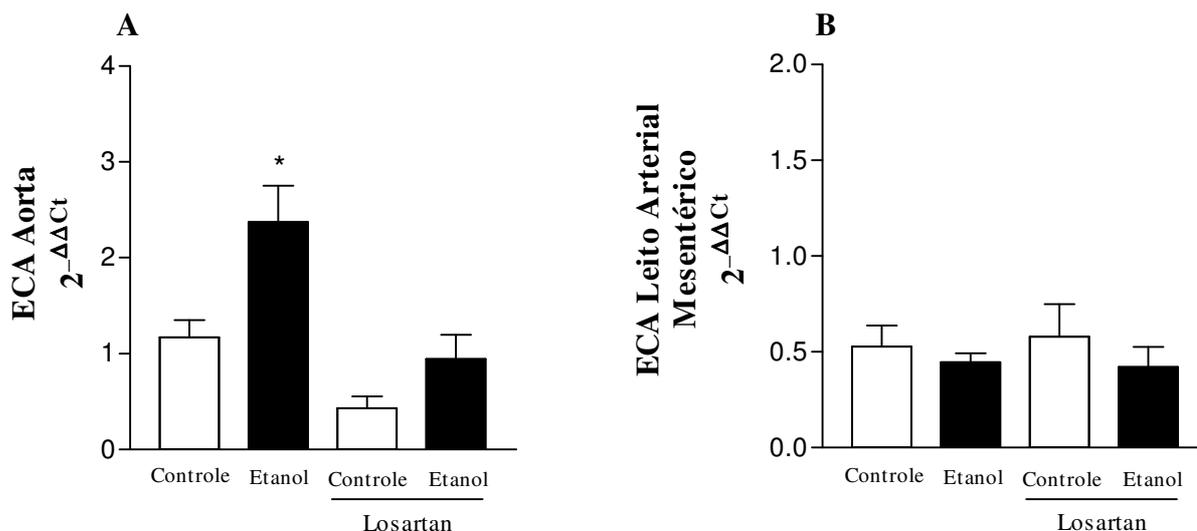


Figura 29. Efeito do consumo crônico de etanol sobre a expressão gênica da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) de ratos. As barras representam as dosagens do homogenato de anéis de artéria aorta torácica (A) e leito arterial mesentérico (B) de animais do grupo controle, etanol, controle tratado com losartan (10 mg/kg via oral) ou etanol tratado com losartan. Os valores representam a média \pm E.P.M. ($n = 8 - 10$ animais). *Diferença em relação ao grupo controle, controle + losartan e etanol + losartan ($p < 0,05$, ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls).

O homogenato das amostras de artéria aorta torácica dos ratos tratados cronicamente com etanol demonstraram aumento na expressão gênica para o gene da nNOS. O tratamento com o losartan preveniu o aumento da expressão deste gene induzido pelo etanol (Figura 30 A). Não houve alteração da expressão gênica da nNOS para as amostras de leito arterial mesentérico de ratos tratados cronicamente com etanol (Figura 30 B).

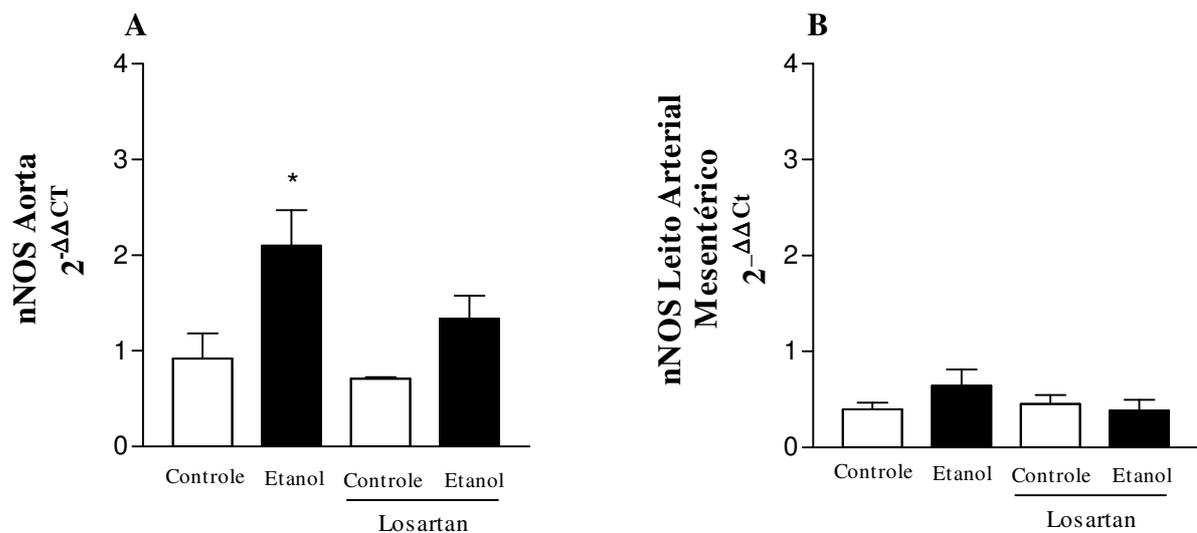


Figura 30. Efeito do consumo crônico de etanol sobre a expressão gênica da nNOS de ratos. As barras representam as dosagens do homogenato de anéis de artéria aorta torácica (A) e leito arterial mesentérico (B) de animais do grupo controle, etanol, controle tratado com losartan (10 mg/kg via oral) ou etanol tratado com losartan. Os valores representam a média \pm E.P.M. ($n = 8 - 10$ animais). *Diferença em relação ao grupo controle, controle + losartan e etanol + losartan ($p < 0,05$, ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls).

Não houve alteração na expressão gênica da iNOS para as amostras de artéria aorta torácicas e leito arterial mesentérico, tratadas cronicamente com etanol como demonstrado na Figura 31.

As amostras de artéria aorta torácica dos ratos tratados cronicamente com etanol demonstraram aumento na expressão gênica para o gene da eNOS. O tratamento com o losartan preveniu o aumento da expressão deste gene induziu pelo etanol (Figura 32 A).

Não houve alteração da expressão gênica da eNOS para as amostras de leito arterial mesentérico de ratos tratados cronicamente com etanol (Figura 32 B).

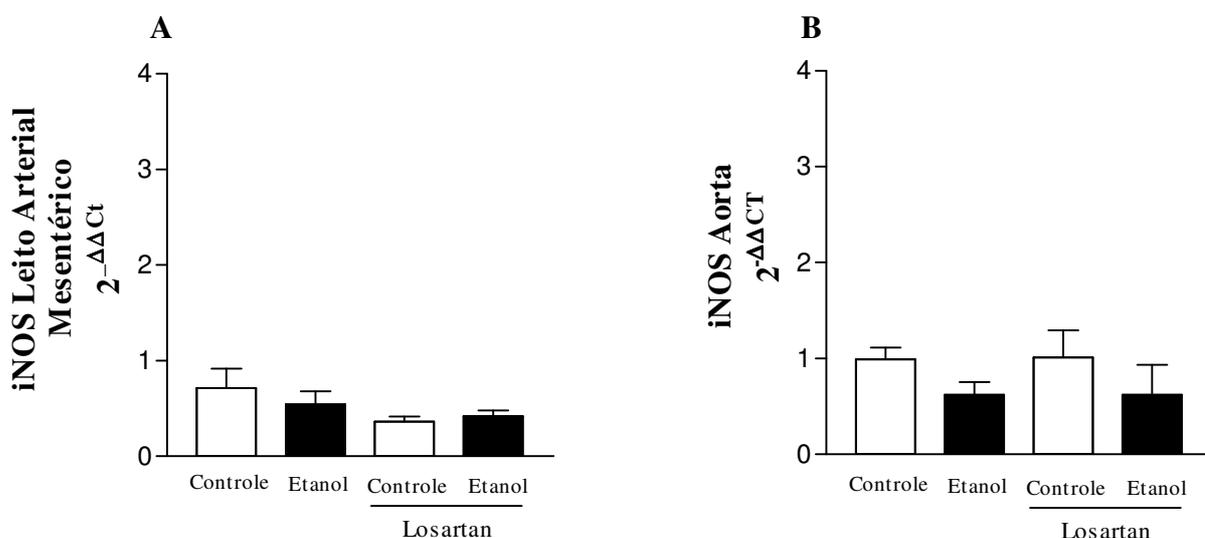


Figura 31. Efeito do consumo crônico de etanol sobre a expressão gênica da iNOS de ratos. As barras representam as dosagens do homogenato de anéis de artéria aorta torácica (A) e leito arterial mesentérico (B) de animais do grupo controle, etanol, controle tratado com losartan (10 mg/kg via oral) ou etanol tratado com losartan. Os valores representam a média \pm E.P.M. (n = 8 - 10 animais).

Não foi observada nenhuma alteração na expressão gênica da Akt para as amostras de artéria aorta torácicas e leito arterial mesentérico, tratadas cronicamente com etanol como demonstrado na Figura 33.

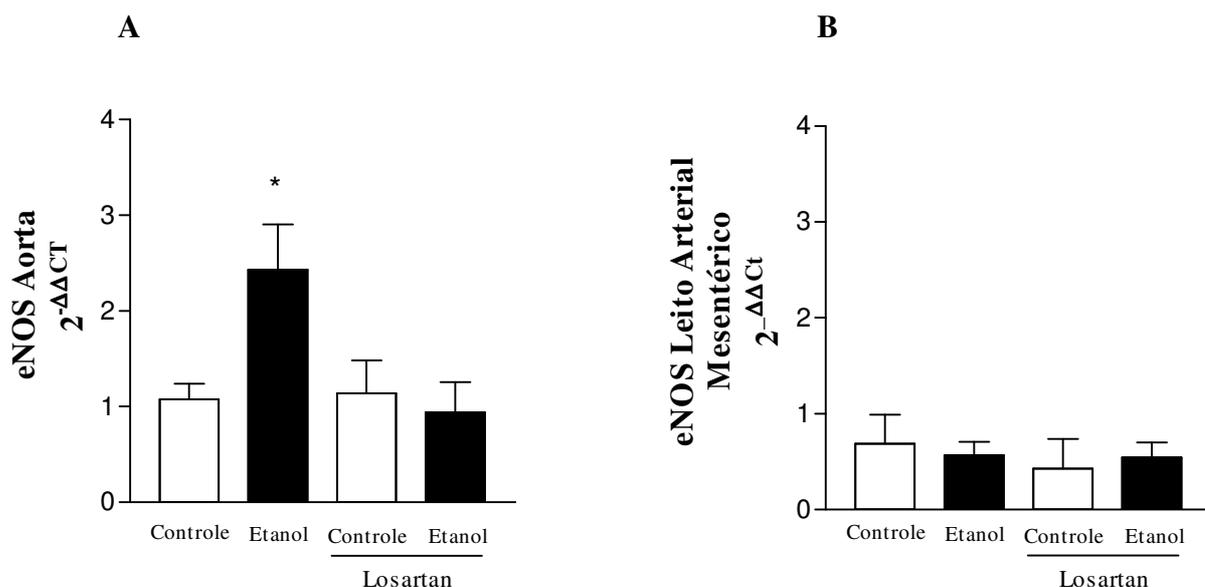


Figura 32. Efeito do consumo crônico de etanol sobre a expressão gênica da eNOS de ratos. As barras representam as dosagens do homogenato de anéis de artéria aorta torácica (A) e leito arterial mesentérico (B) de animais do grupo controle, etanol, controle tratado com losartan (10 mg/kg via oral) ou etanol tratado com losartan. Os valores representam a média \pm E.P.M. (n = 8 - 10 animais). *Diferença em relação ao grupo controle, controle + losartan e etanol + losartan (p<0,05, ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls).

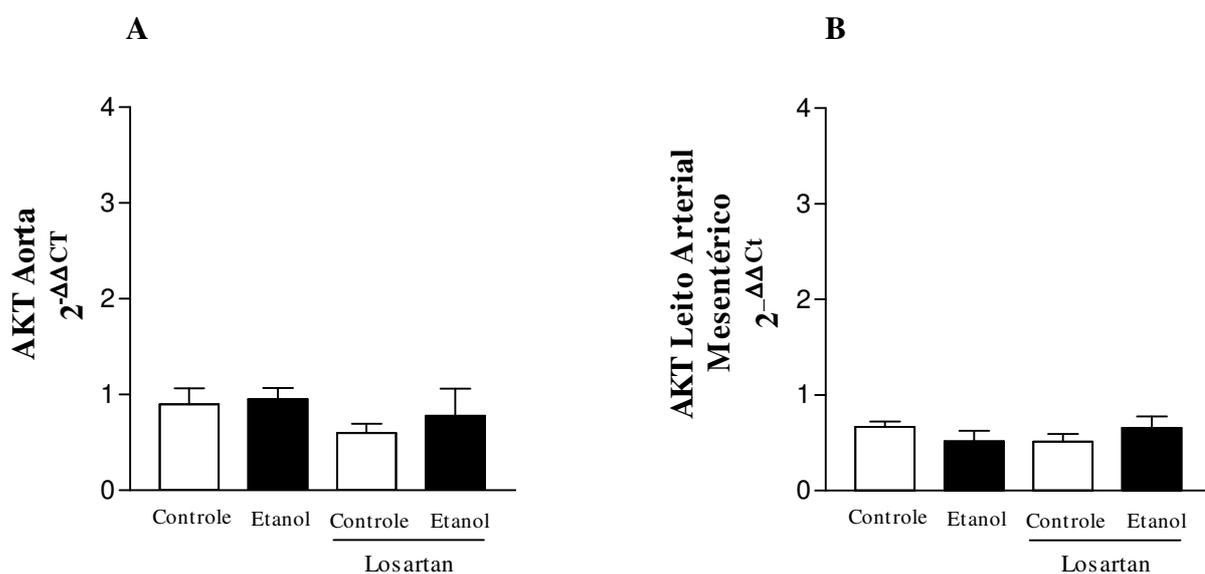


Figura 33. Efeito do consumo crônico de etanol sobre a expressão gênica da AKT de ratos. As barras representam as dosagens do homogenato de anéis de artéria aorta torácica (A) e leito arterial mesentérico (B) de animais do grupo controle, etanol, controle tratado com losartan (10 mg/kg via oral) ou etanol tratado com losartan. Os valores representam a média \pm E.P.M. (n = 8 - 10 animais).

O tratamento crônico com etanol não afetou a expressão gênica da COX1 tanto nas amostras de aorta torácica quanto nas de leito arterial mesentérico (Figura 34, A e B).

Houve aumento na expressão gênica da COX2 no homogenato de aorta torácica dos ratos tratados cronicamente com etanol e a presença do losartan preveniu tal resposta (Figura 34 C). Porém, não houve alteração da expressão gênica da COX2 nas amostras de leito arterial mesentérico (Figura 34 D).

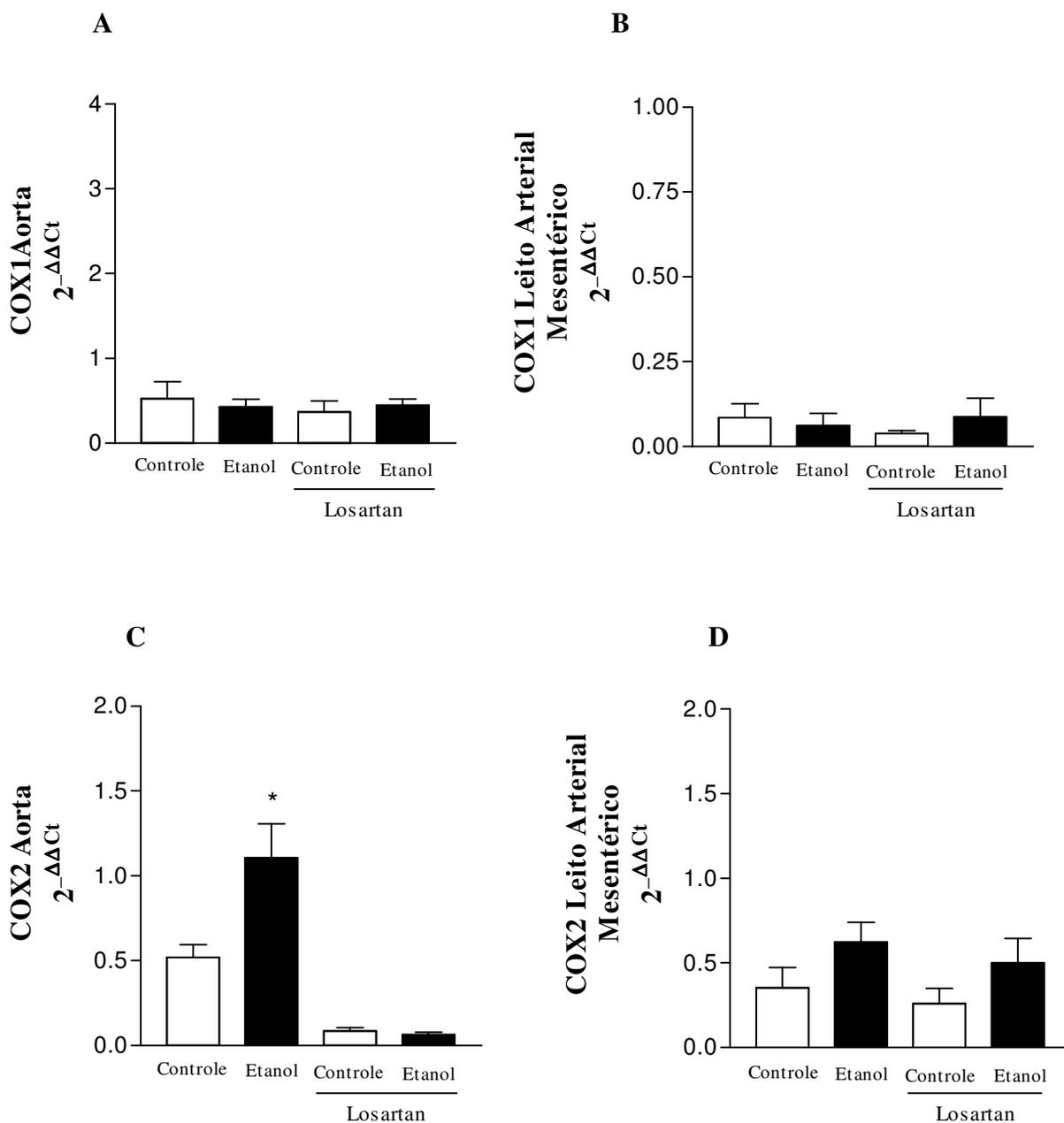


Figura 34. Efeito do consumo crônico de etanol sobre a expressão gênica da COX1 e COX2 de ratos. As barras representam as dosagens do homogenato de anéis de artéria aorta torácica (A e C) e leito arterial mesentérico (B e D) de animais do grupo controle, etanol, controle tratado com losartan (10 mg/kg via oral) ou etanol tratado com losartan. Os valores representam a média \pm E.P.M. (n = 8 - 10 animais). *Diferença em relação ao grupo controle, controle + losartan e etanol + losartan ($p < 0,05$, ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls).

5.22. Efeito do consumo crônico de etanol sobre a expressão protéica

O consumo crônico de etanol não foi capaz de afetar a expressão protéica para a p38 MAPK total (38 kDa) em homogenatos de aorta torácica e leito arterial mesentérico (Figura 35).

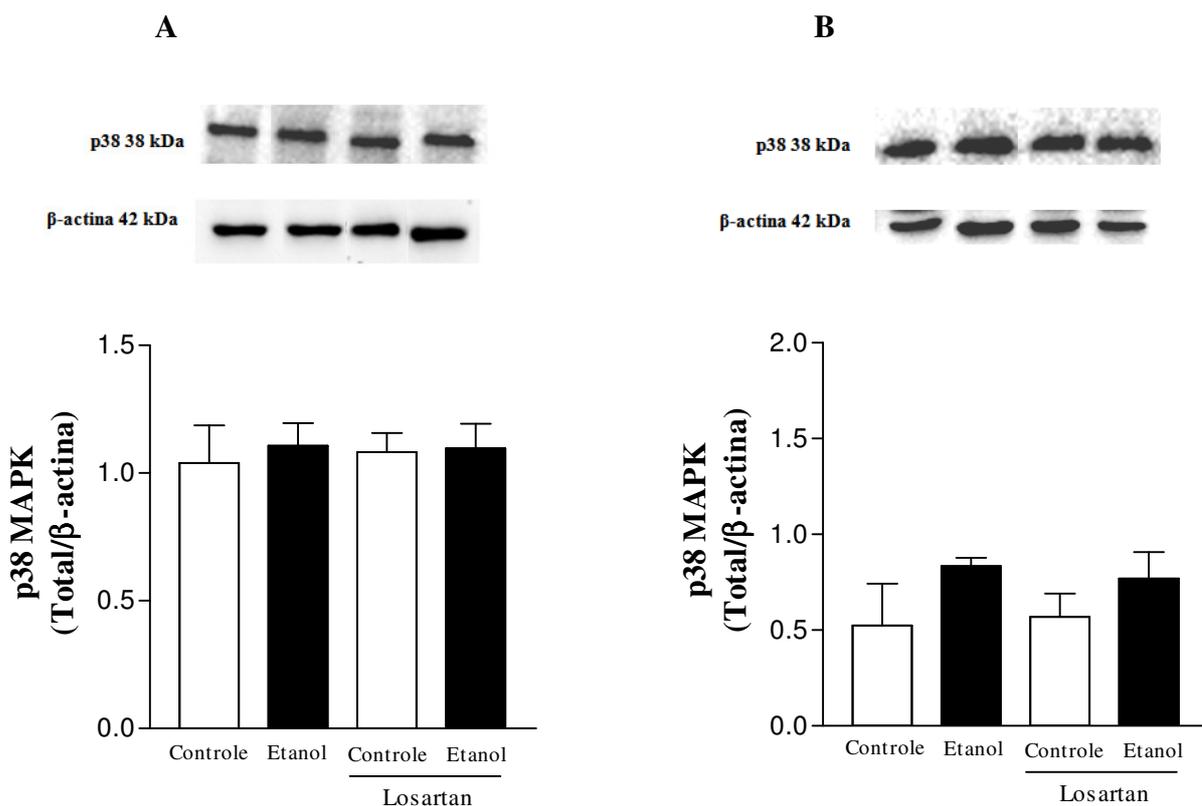


Figura 35. Efeito do consumo crônico de etanol sobre a expressão protéica da p38 MAPK total de ratos. As barras representam as dosagens do homogenato de anéis de artéria aorta torácica (A) e leito arterial mesentérico (B) de animais do grupo controle, etanol, controle tratado com losartan (10 mg/kg via oral) ou etanol tratado com losartan. Os valores representam a média \pm E.P.M. (n = 4-5 animais).

O consumo crônico de etanol não foi capaz de afetar a fosforilação da p38 MAPK (Thr¹⁸⁰/Tyr¹⁸²) em homogenatos de aorta torácica (Figura 36).

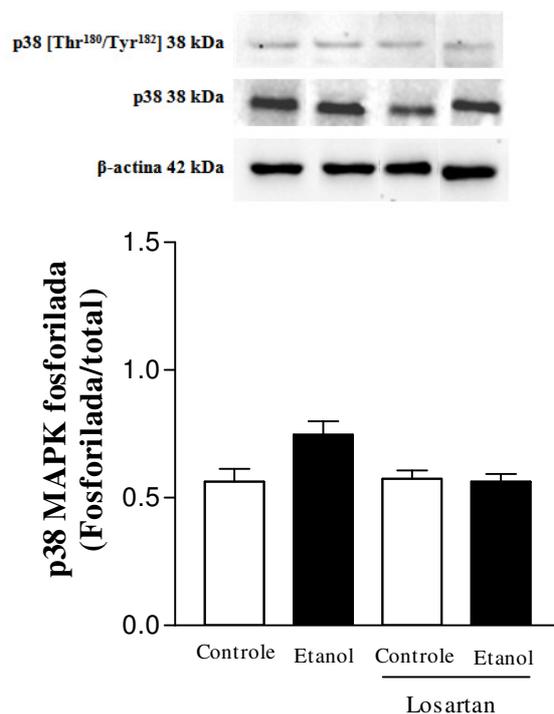


Figura 36. Efeito do consumo crônico de etanol sobre a expressão protéica p38 MAPK fosforilada (Thr¹⁸⁰/Tyr¹⁸²) de ratos. As barras representam as dosagens do homogenato de anéis de artéria aorta torácica de animais do grupo controle, etanol, controle tratado com losartan (10 mg/kg via oral) ou etanol tratado com losartan. Os valores representam a média ± E.P.M. (n = 4-5 animais).

O consumo crônico de etanol não foi capaz de afetar a expressão protéica para a JNK/SAPK MAPK total (52 kDa) em homogenatos de aorta torácica e leito arterial mesentérico (Figura 37 A e B).

O tratamento crônico com etanol não foi capaz de promover o aumento significativo da expressão protéica da JNK/SAPK MAPK fosforilada (Thr¹⁸³/Tyr¹⁸⁵) em homogenatos de artéria aorta torácica (Figura 37 C e D).

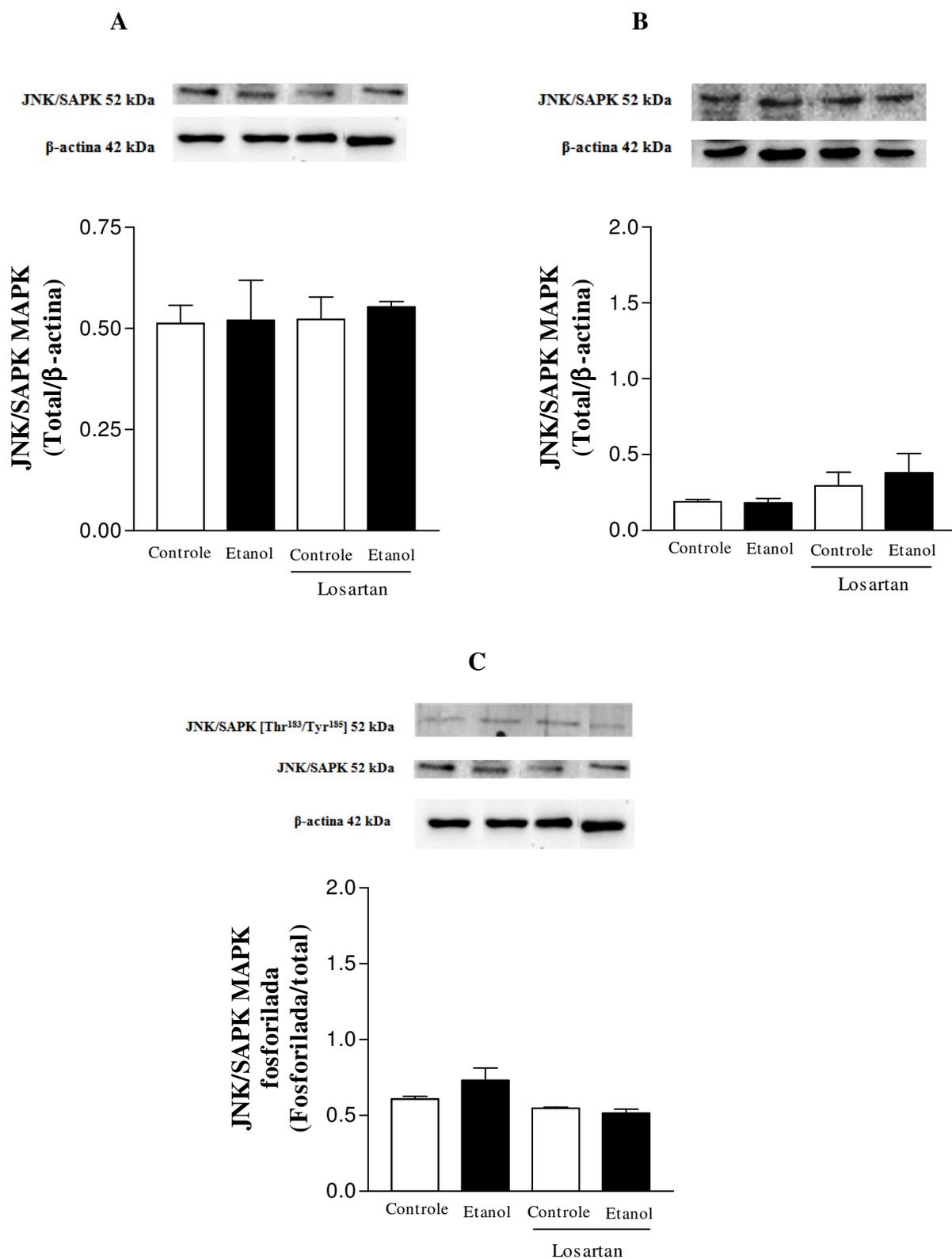


Figura 37. Efeito do consumo crônico de etanol sobre a expressão protéica JNK/SAPK total e fosforilada (Thr¹⁸³/Tyr¹⁸⁵) de ratos. As barras representam as dosagens do homogenato de anéis de artéria aorta torácica (A e C) e leito arterial mesentérico (B) de animais do grupo controle, etanol, controle tratado com losartan (10 mg/kg via oral) ou etanol tratado com losartan. Os valores representam a média ± E.P.M. (n = 4-5 animais).

O consumo crônico de etanol não foi capaz de afetar a expressão protéica para a ERK1/2 MAPK total (42/44 kDa) em homogenatos de aorta torácica e leito arterial mesentérico (Figura 38).

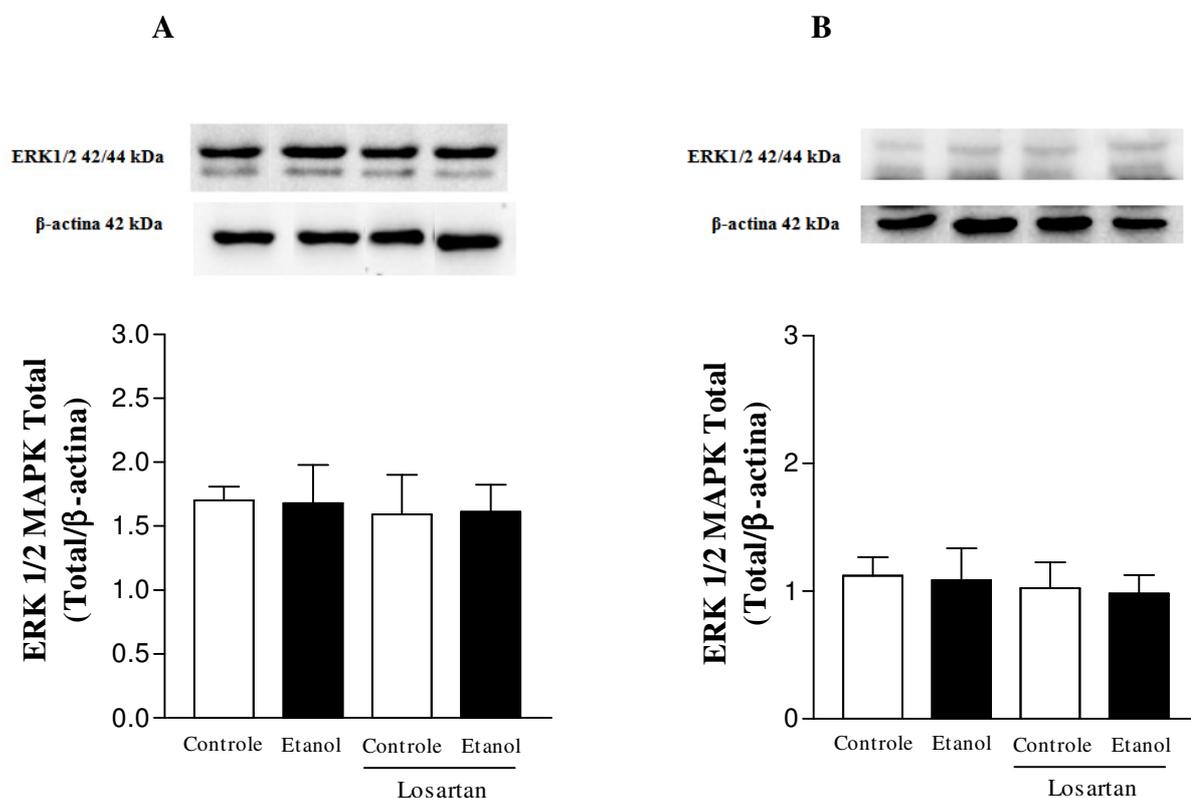


Figura 38. Efeito do consumo crônico de etanol sobre a expressão protéica ERK 1/2 total de ratos. As barras representam as dosagens do homogenato de anéis de artéria aorta torácica (A) e leito arterial mesentérico (B) de animais do grupo controle, etanol, controle tratado com losartan (10 mg/kg via oral) ou etanol tratado com losartan. Os valores representam a média \pm E.P.M. (n = 4-5 animais).

O tratamento crônico com etanol foi capaz de aumentar, de forma significativa, a expressão protéica da ERK 1/2 fosforilada (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴) em homogenatos de artéria aorta torácica (Figura 39).

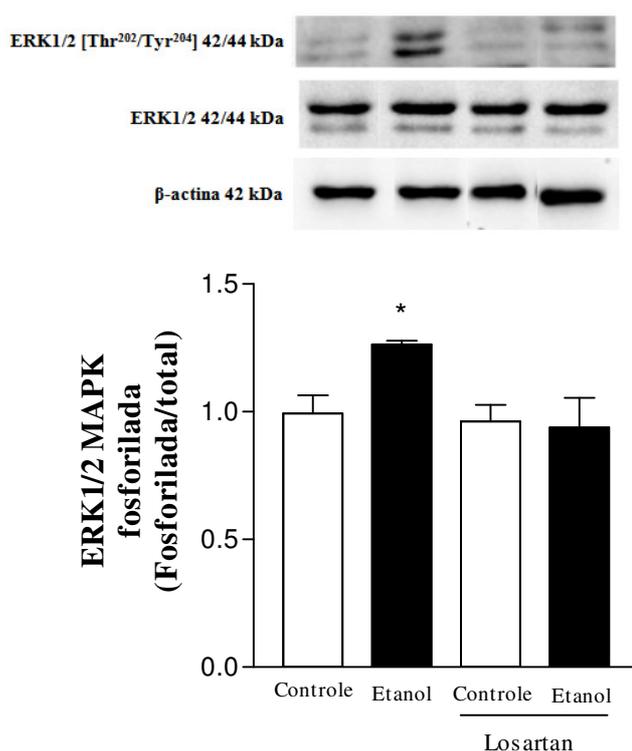


Figura 39. Efeito do consumo crônico de etanol sobre a expressão protéica ERK 1/2 fosforilada (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴) de ratos. As barras representam as dosagens do homogenato de anéis de artéria aorta torácica de animais do grupo controle, etanol, controle tratado com losartan (10 mg/kg via oral) ou etanol tratado com losartan. Os valores representam a média ± E.P.M. (n = 4-5 animais). *Diferença em relação ao grupo controle, controle + losartan e etanol + losartan (p<0,05, ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls).

O tratamento crônico com etanol não foi capaz de promover o aumento significativo da expressão protéica do receptor AT₂ (41kDa) e da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) (180 kDa) em homogenatos de artéria aorta torácica e de leite arterial mesentérico (Figuras 40 e 41).

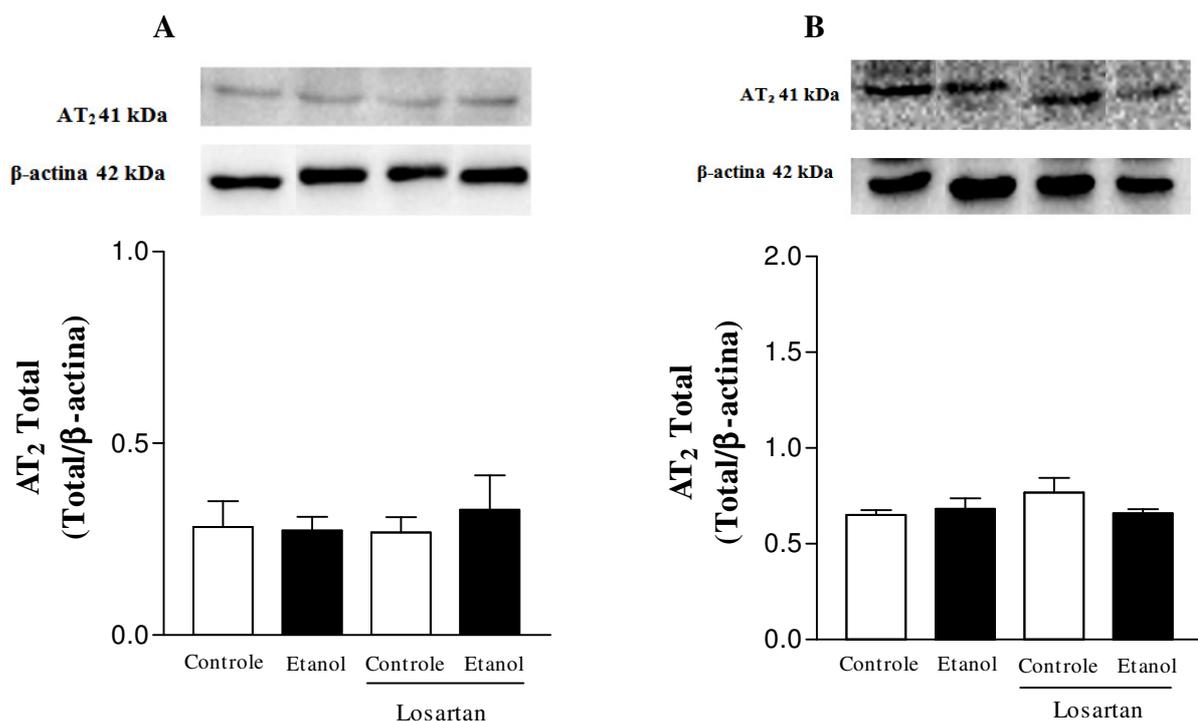


Figura 40. Efeito do consumo crônico de etanol sobre a expressão protéica do receptor AT₂ de ratos. As barras representam as dosagens do homogenato de anéis de artéria aorta torácica (A) e leito arterial mesentérico (B) de animais do grupo controle, etanol, controle tratado com losartan (10 mg/kg via oral) ou etanol tratado com losartan. Os valores representam a média ± E.P.M. (n = 4-5 animais).

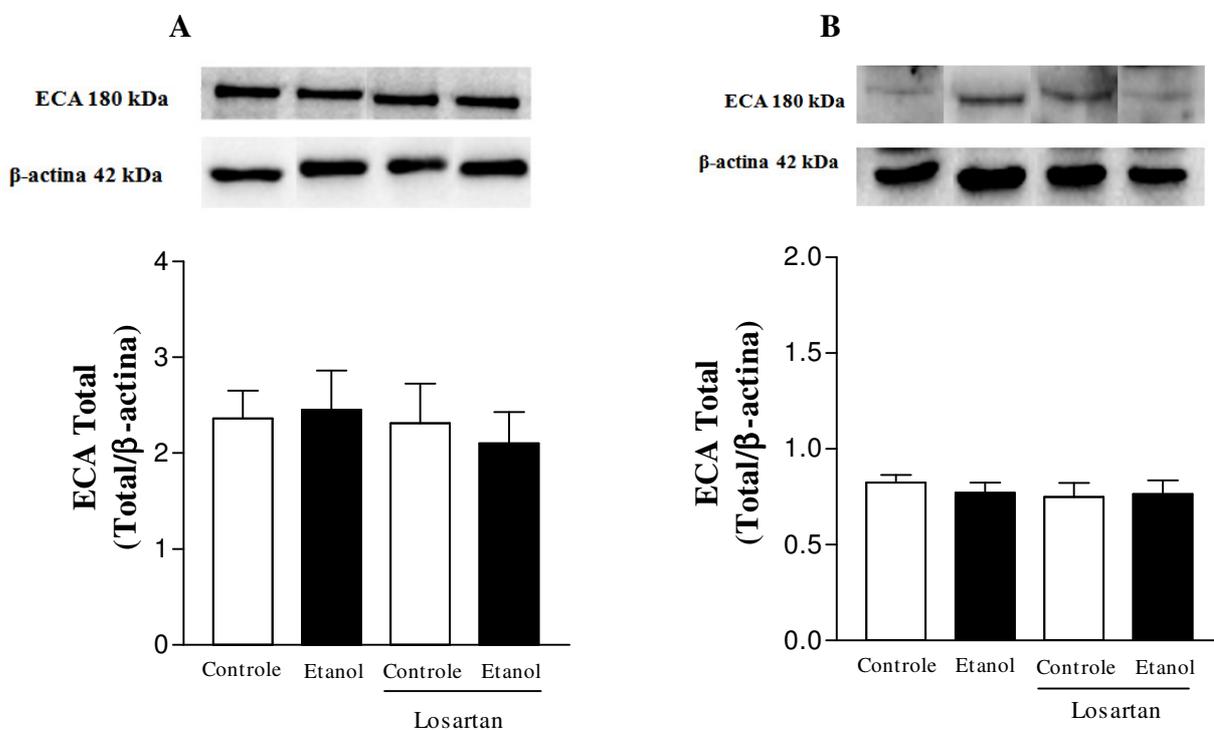


Figura 41. Efeito do consumo crônico de etanol sobre a expressão protéica da ECA de ratos. As barras representam as dosagens do homogenato de anéis de artéria aorta torácica (A) e leito arterial mesentérico (B) de animais do grupo controle, etanol, controle tratado com losartan (10 mg/kg via oral) ou etanol tratado com losartan. Os valores representam a média ± E.P.M. (n = 4-5 animais).

O tratamento crônico com etanol não afetou a expressão protéica das isoformas da Óxido Nítrico Sintase (NOS: nNOS 160 kDa, iNOS 130 kDa e eNOS 135 kDa) em amostras de aorta torácica de ratos (Figura 42).

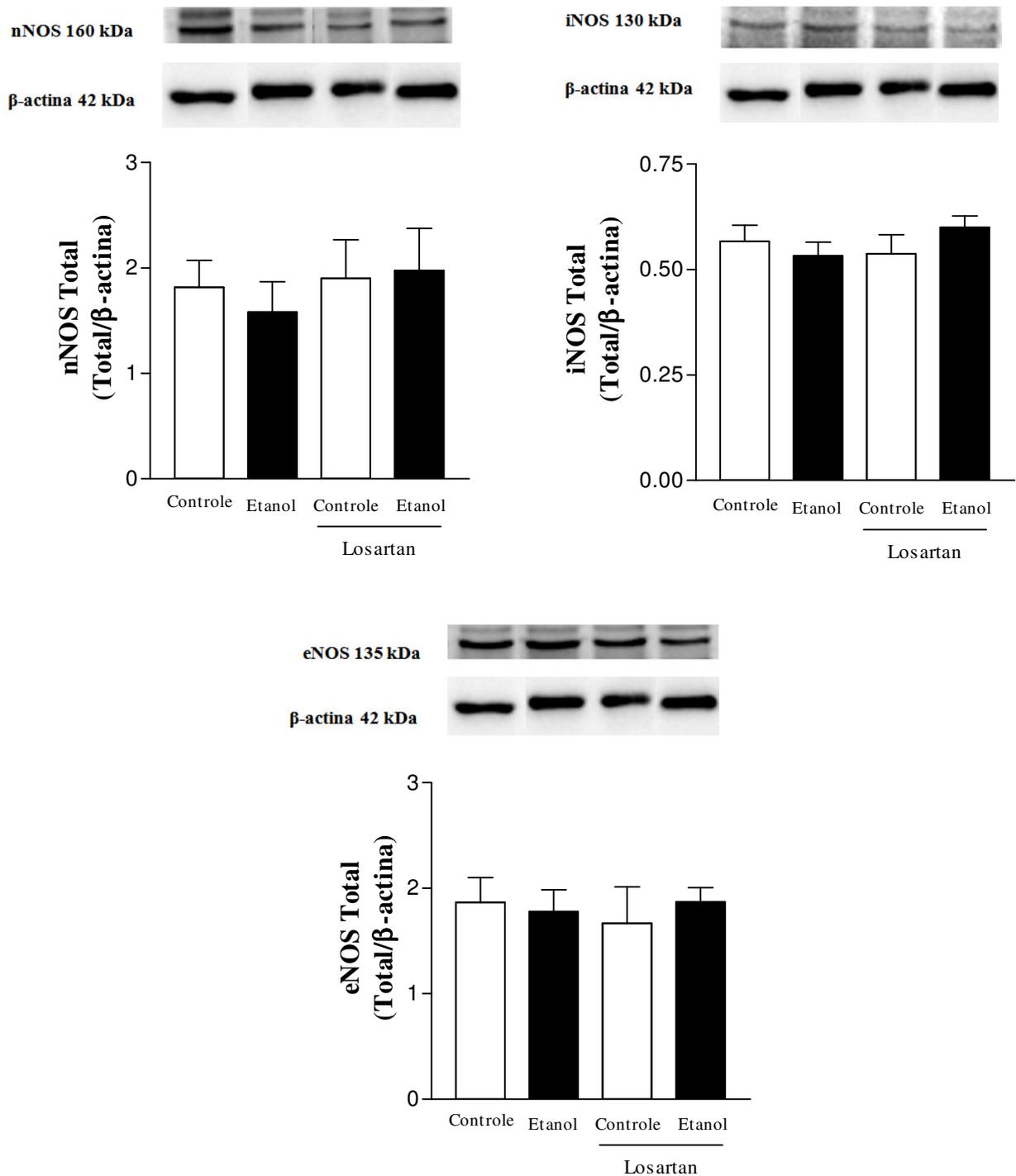


Figura 42. Efeito do consumo crônico de etanol sobre a expressão protéica das isoformas da NOS. As barras representam as dosagens do homogenato de anéis de artéria aorta torácica de animais do grupo controle, etanol, controle tratado com losartan (10 mg/kg via oral) ou etanol tratado com losartan. Os valores representam a média \pm E.P.M. (n = 4-5 animais).

O tratamento crônico de etanol também não foi capaz de afetar a expressão protéica da AkT total (56 kDa) e fosforilada (Ser⁴⁷³) em aorta torácica de ratos (Figura 43).

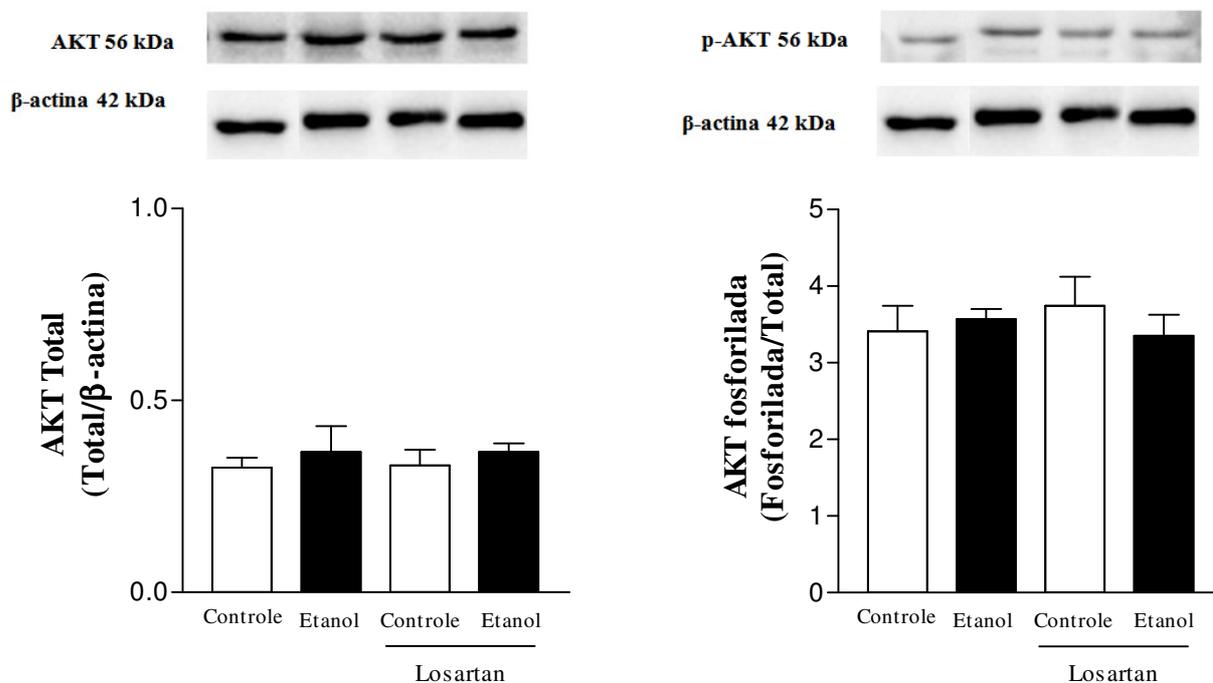


Figura 43. Efeito do consumo crônico de etanol sobre a expressão protéica da AKT total e fosforilada. As barras representam as dosagens do homogenato de anéis de artéria aorta torácica de animais do grupo controle, etanol, controle tratado com losartan (10 mg/kg via oral) ou etanol tratado com losartan. Os valores representam a média ± E.P.M. (n = 4-5 animais).

O tratamento crônico com etanol não afetou a expressão protéica da COX-1 (73 kDa) em amostras de aorta torácica de ratos (Figura 44). Entretanto, o etanol foi capaz de induzir a COX2 (69 kDa) em homogenato de aorta torácica e o tratamento com losartan não foi capaz de prevenir este efeito nos ratos (Figura 44).

O tratamento crônico com etanol induziu o aumento da expressão protéica da NOX 1 (65 kDa). O losartan foi capaz de prevenir o aumento na expressão desta proteína na aorta torácica dos animais tratados com etanol (Figura 45).

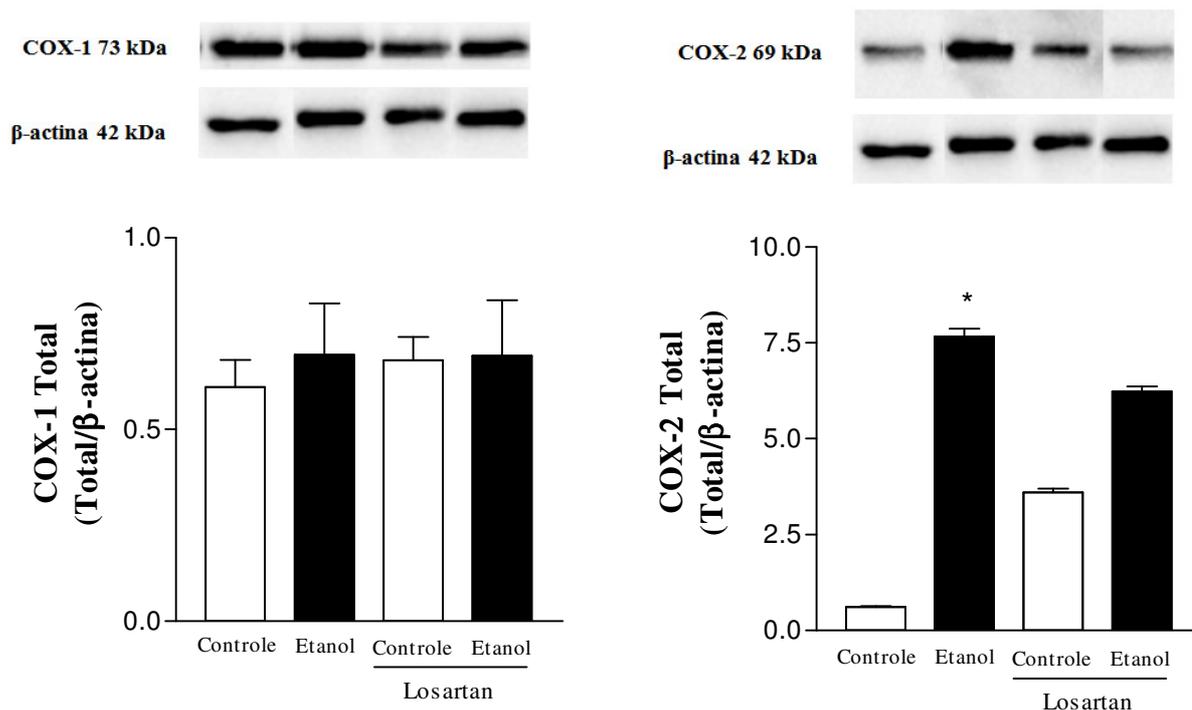


Figura 44. Efeito do consumo crônico de etanol sobre a expressão protéica das isoformas da ciclooxigenase, COX1 e COX2. As barras representam as dosagens do homogenato de anéis de artéria aorta torácica de animais do grupo controle, etanol, controle tratado com losartan (10 mg/kg via oral) ou etanol tratado com losartan. Os valores representam a média \pm E.P.M. (n = 4-5 animais). *Diferença em relação ao grupo controle e controle + losartan ($p < 0,05$, ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls).

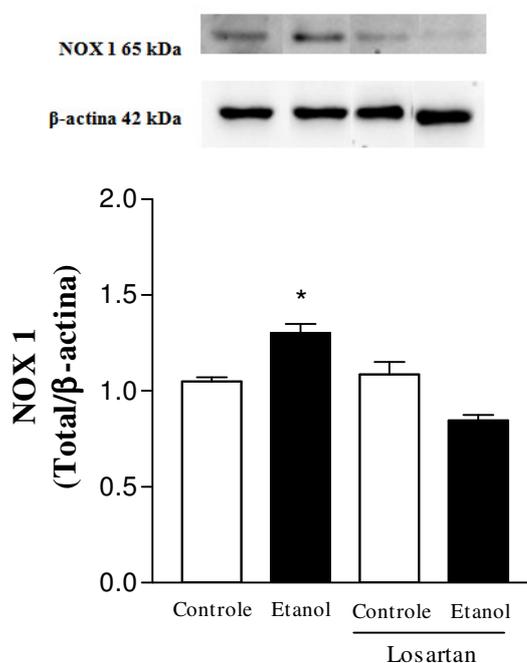


Figura 45. Efeito do consumo crônico de etanol sobre a expressão protéica da NOX1. As barras representam as dosagens do homogenato de anéis de artéria aorta torácica de animais do grupo controle, etanol, controle tratado com losartan (10 mg/kg via oral) ou etanol tratado com losartan. Os valores representam a média \pm E.P.M. (n = 4-5 animais). *Diferença em relação ao grupo controle, controle + losartan e etanol + losartan ($p < 0,05$, ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls).



Fonte: Autor desconhecido.

6. DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo mostram que o consumo crônico de etanol: 1) reduz significativamente o peso dos animais, além do consumo de ração e ingestão de líquido, e tais respostas foram prevenidas pelo uso do losartan; 2) aumenta a pressão arterial sistólica, diastólica e média dos animais, sem afetar a frequência cardíaca, sendo estes efeitos prevenidos pelo uso do losartan; 3) estimula o SRA sistêmico; 4) não altera a osmolaridade plasmática e os níveis plasmáticos de sódio; 5) reduz os níveis de OT e AVP, e aumenta os níveis do ANP e corticosterona, e o tratamento com losartan não afetou tais respostas; 6) induz estresse oxidativo sistêmico e tecidual; sendo prevenido pelo tratamento com losartan; 7) altera a reatividade vascular; 8) reduz a biodisponibilidade plasmática e tecidual do NO, prevenida pelo uso do losartan; 9) altera a expressão gênica e protéica da via das MAPKs, das COX, da via do NO, além dos componentes do SRA.

O modelo experimental padronizado por Tirapelli *et al.* (2006a,b) e empregado neste trabalho demonstrou níveis sanguíneos de etanol condizentes a outros tratamentos utilizados na literatura, tais como no estudo de Husain *et al.* (2004) e Tirapelli *et al.* (2008), que foi capaz de promover alterações significativas no sistema cardiovascular. O presente estudo indicou que a administração crônica de etanol e seu nível plasmático correspondem ao padrão humano de, aproximadamente, quatro doses diárias de bebidas alcoólicas (4,0 g/Kg; 20% v/v), consumo este denominado “abusivo” (BEULENS *et al.*, 2007, HUSAIN *et al.*, 2011). Estudos clínicos como o de Wilsnack e Wilsnack (1997) já demonstravam que o consumo crônico de etanol apresentava maiores chances de alteração do estado nutricional, com alteração perceptível do peso corpóreo. Chan *et al.* (1985), também demonstram em modelo animal, redução do peso corpóreo médio de ratos tratados cronicamente com etanol (20% por 12 semanas) em relação aos animais do grupo controle. Tesfamariam *et al.* (1991) já demonstravam que os efeitos do etanol sobre o organismo poderiam ser explicados, em parte, devido a alteração do estado nutricional e das taxas de glicose circulante.

A perda gradativa do peso médio dos animais tratados cronicamente com etanol pode ser também justificada pela redução no consumo médio de ração e na ingestão de líquido durante o período de tratamento. Tal resultado foi semelhante ao encontrado por Laure-Achagiotis *et al.*, (1990), Gill *et al.*, (1996), Stewart e Kennedy (1999), Aguiar *et al.* (2004) e no estudo de Tirapelli *et al.* (2008), onde os animais tratados por duas semanas, seguindo o mesmo modelo experimental, houve a redução gradativa no consumo de líquido e de ração.

Na literatura científica há muitos estudos que já demonstraram a associação entre o consumo crônico de etanol e disfunções cardiovasculares (ALTURA; ALTURA, 1982; STRICKLANDAND; WOOLES, 1988; HATTON *et al.*, 1992; DI CASTELNUOVO *et al.*, 2009). Assim, o etanol atua como um importante fator de risco no desenvolvimento de doenças cardiovasculares, como por exemplo, a hipertensão arterial (KLATSKY *et al.*, 1977, 1986; MILON *et al.*, 1982; MACMAHON, 1987; VANDER, 1988; FUCHS *et al.*, 2001; SKLIROS *et al.*, 2012). O aumento da pressão arterial associado ao consumo crônico de etanol é um fenômeno amplamente documentado na literatura científica. Diversos estudos clínicos e experimentais já demonstraram a associação entre o consumo crônico de etanol e o aumento da pressão arterial, sem que houvesse alteração da frequência cardíaca (CLARCK, 1985; ABDEL-RAHMAN; WOOLES, 1987). Corroborando com os trabalhos anteriormente descritos (CHAN *et al.*, 1985; HUSAIN *et al.*, 2004, 2005; RESTEL *et al.*, 2006, 2008; FRITZ; RINALDI, 2008; HUSAIN *et al.*, 2011; SHIRPOOR *et al.*, 2012), o modelo de consumo crônico de etanol do presente estudo foi capaz de induzir aumento das pressões arteriais sistólica, diastólica e média, sem apresentar alteração da frequência cardíaca. Também se constatou que o aumento da pressão era prevenido pelo tratamento com o losartan, antagonista do receptor AT₁. Tal resposta deve ser ressaltada como importante contribuição para o esclarecimento dos mecanismos pelos quais o etanol promove a elevação da pressão arterial sistêmica, uma vez que esta informação ainda não está bem elucidada na literatura científica.

A ativação e a participação do SRA na resposta pressórica induzida pelo modelo de consumo crônico de etanol neste estudo, também pode ser constatada pelo aumento dos níveis plasmáticos de ANG I, fato que está em acordo com estudos previamente publicados (ZANCHETTI *et al.*, 1976; NIEMINEN *et al.*; 1981; YOGI *et al.*, 2012). A elevação plasmática de ANG I foi resultante do aumento da atividade plasmática da renina. Assim, nossos dados corroboram esses estudos prévios demonstrando um aumento significativo da atividade plasmática da renina induzido pelo consumo crônico de etanol em ratos. Além do aumento induzido pelo consumo de etanol, observamos que o tratamento com losartan também induziu aumento da atividade da renina plasmática. De fato, essa resposta foi previamente descrita em estudos em humanos e animais. O mecanismo pela qual este efeito ocorre foi demonstrado no estudo de Pals e Couch (1993), onde foi estabelecida, com o uso de losartan, a participação do receptor AT₁ na mediação de uma retroalimentação negativa (*feedback* negativo) pela ANG II sobre a liberação da renina. O aumento da atividade

plasmática da renina induzida pelo tratamento com losartan foi posteriormente mostrado em cães e humanos (CHRISTEN *et al.*, 1991; KREBS *et al.*, 1999).

Estudos avaliando o consumo crônico de etanol em modelos animais demonstraram um aumento plasmático de ANG II, da atividade da ECA e de ANG II (HUSAIN *et al.*, 2011; TAN *et al.*, 2012; YANG *et al.*, 2012). Nossos dados também corroboram com esses estudos mostrando que houve aumento dos níveis plasmáticos de ANG II, além do aumento da atividade plasmática da ECA em nosso modelo. No entanto, não observamos alterações dos níveis desses peptídeos na vasculatura, tanto em vaso de condutância (aorta) como de resistência (leito mesentérico) e nem na atividade da ECA. Portanto, em conjunto, nossos resultados mostram que o consumo crônico de etanol estimula o SRA sistêmico com aumento da atividade da renina e dos níveis plasmáticos de ANG I e ANG II, sem exercer, no entanto, efeito no SRA vascular.

A ANG II, produto biologicamente ativo do SRA, tem seus efeitos mediados por seus receptores do tipo 1 e 2 (AT₁ e AT₂, respectivamente) (KASCHINA; UNGER, 2003). Nossos dados demonstraram o aumento da expressão gênica do receptor AT₁ e da ECA na aorta torácica e no leito arterial mesentérico dos animais tratados cronicamente com etanol. O aumento da expressão gênica do receptor AT₁ também foi observado por Cheng; Cheng e Cunningham (2006) em cães tratados cronicamente com etanol, sendo esta resposta prevenida pelo uso do irbesartan, um antagonista do receptor AT₁. O mesmo perfil de resposta foi observada por Tan *et al.* (2012) em ratos tratados cronicamente com etanol. Em nosso estudo também se observou o aumento da expressão gênica do AT₂ no grupo de animais que consumiram etanol e foram tratados com losartan. Entretanto, tais dados discordam com os achados de Polikandriotis *et al.* (2006) onde se observou um aumento da expressão protréica de AT₁ e AT₂ no pulmão de animais tratados cronicamente com etanol.

Os receptores AT₁ são responsáveis pelos principais efeitos da ANG II em adultos, tais como a secreção de aldosterona, a contração vascular, sede e apetite ao sódio (KASCHINA; UNGER, 2003). Os mineralocorticóides são secretados principalmente em condições de deficiência corporal de sódio ou aumento na ativação do SRA, tendo a ANG II como principal secretagogo (LARAGH, *et al.*, 1960; MUSABAYANE *et al.*, 1993, 1994). Assim, qualquer modificação neste sistema influenciaria no controle hidroeletrólítico. Há relatos literários que indicam a associação do etanol com as alterações em mecanismos neuro-humorais que controlam a liberação de substâncias endógenas envolvidas na manutenção das funções cardiovasculares (IBSEN *et al.*, 1985). Os dados do presente estudo demonstraram que no modelo crônico de etanol, não houve alteração dos níveis plasmáticos de sódio, na

osmolaridade e nos níveis plasmáticos de aldosterona. Tais dados discordam com outros estudos descritos na literatura científica que demonstraram que a administração crônica de etanol influencia na síntese de aldosterona, nos níveis plasmáticos de Sódio e conseqüentemente na osmolaridade plasmática (HOSTETLER; RICHMAN, 1982; NIEMINEN *et al.*, 1981; COLLINS *et al.*, 1992). Entretanto, o estudo de Nieminen *et al.* (1985) também não constatou um aumento plasmático de aldosterona, justificado pela redução plasmática de potássio e conseqüente redução na relação de sódio e potássio. A concentração e tempo de exposição ao etanol poderiam justificar a discrepância em relação aos dados anteriormente descritos na literatura científica. Entretanto, Allen *et al.* (1998, 1999) demonstraram que estas pequenas alterações da osmolaridade plasmática são suficientes na promoção de um quadro de hiperosmolaridade, aumento da pressão arterial e conseqüente ativação dos barorreceptores, que posteriormente favorece o início de respostas endócrinas. Dessa forma, sugere-se que a hiperosmolaridade possa ter ocorrido no presente estudo, porém este quadro foi constantemente revertido pelo organismo, o que dificultou tal detecção pela técnica utilizada, corroborando com estudos que já demonstraram que o consumo crônico de etanol é capaz de induzir a hiperosmolaridade (MILLERCHOEN; RIGGS, 1969; COLLINS *et al.*, 1992). Portanto, esse processo também poderia estar associado ao aumento da pressão arterial induzido pelo consumo de etanol. Esta sugestão também pode ser fortemente relacionada às alterações neuro-humorais observadas no decorrer do estudo, como por exemplo, no aumento dos níveis plasmáticos no Peptídeo Natriurético Atrial (ANP).

Os peptídeos natriuréticos são hormônios que participam do controle da função cardiovascular. O ANP é sintetizado pelos cardiomiócitos atriais e secretado sob o estímulo do estiramento da parede do átrio direito, geralmente conseqüência do aumento da volemia (DIETZ, 2005). Dados apresentados pelo “*Framingham Heart Study*” sugeriram que a concentração plasmática do ANP serve como ferramenta preditora de fatores de risco para as doenças cardiovasculares. Estudos clínicos como os de Colantonio *et al.* (1991) e Gianoulakis *et al.* (1997) demonstraram associação positiva entre o consumo de etanol e o aumento dos níveis plasmáticos de ANP.

Nosso estudo mostrou que o consumo de etanol aumenta os níveis plasmáticos de ANP em resposta ao aumento das pressões sistólica, diastólica e média induzidas pelo consumo crônico de etanol, independentemente da ação da ANG II sob o receptor AT₁. Tais respostas observadas estão em acordo com estudos previamente publicados (BLAINE, 1990; JAMISON *et al.*, 1992; GUILLAUME *et al.*, 1994; DJOUSSÉ *et al.*, 2006).

A ativação do SRA, como descrito anteriormente, é um dos mecanismos constatados pelas quais o consumo crônico de etanol promove a elevação na pressão arterial. Entretanto, outras teorias também têm sido aventadas para explicar a hipertensão arterial associada ao consumo crônico de etanol. Entre os mecanismos propostos destacam-se as alterações na contratilidade vascular, promoção do estresse oxidativo, estimulação do sistema nervoso simpático e alterações neuro-humorais.

O sistema nervoso central (SNC) também atua na regulação da pressão arterial sob condições fisiopatológicas, tais como no consumo crônico de etanol (THOMAS, 2001; ISRAEL; SOSA-CANACHE, 2002). Um dos mecanismos pelas quais o SNC regula o efeito pressórico é através da modulação do eixo hipotálamo-neurohipofisário. O eixo hipotálamo-neurohipofisário é essencial para a manutenção corporal de água e sódio, participando do controle do volume e da osmolalidade do LEC. Esse sistema é composto por neurônios magnocelulares que possuem seus pericários localizados nos núcleos paraventricular (PVN) e supra-óptico (SON) do hipotálamo e cujos axônios seguem formando tratos que terminam na formação da neurohipófise. Esses neurônios são responsáveis pela síntese dos hormônios vasopressina (AVP) e ocitocina (OT) e por sua secreção, via neurohipófise, para a circulação sistêmica (ANTUNES-RODRIGUES *et al.*, 2004). Dessa maneira, tem sido descrito que o consumo crônico de etanol afeta o eixo hipotálamo-neurohipofisário e resulta em alterações nos sistemas que controlam a liberação de substâncias endógenas envolvidas na manutenção das funções vasculares.

A AVP é um hormônio que tem sua secreção estimulada principalmente pela redução do volume circulante e/ou pressão arterial (maiores que 10%) (ANTUNES-RODRIGUES *et al.*, 2004). Assim, condições fisiopatológicas como a do consumo crônico de etanol que induzem o aumento da pressão arterial servem como estímulo depressor para a produção e liberação de AVP, que terá reduzido seu nível plasmático (ISHIZAWA *et al.*, 1990; SANNA *et al.*, 1993; HARDING *et al.*, 1995). Em nosso estudo, foi observada redução plasmática de vasopressina e o tratamento com o losartan não foi capaz de prevenir este efeito. O losartan possui a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, porém em nosso estudo esta propriedade não foi observada e assim, nenhum efeito protetor pode ser constatado, corroborando com Goa e Wagstaff (1982) que demonstraram que a administração oral (10 mg/kg) ou em doses diárias (três dias consecutivos, dose de 3 mg/kg) de losartan não apresentou a mesma capacidade de atingir estruturas do SNC.

A OT, bem como a AVP, é uma substância endógena com importante papel na manutenção das funções vasculares. Este hormônio atua no controle da homeostase

hidroeletrolítica e do relaxamento do músculo liso vascular, levando a redução da pressão arterial (JANKOWSKI *et al.*, 2000; ANTUNES-RODRIGUES *et al.*, 2004). Em nosso estudo, houve redução dos níveis plasmáticos de OT após tratamento crônico com etanol. Essa resposta também auxiliaria na explicação de não termos observado alteração da osmolaridade plasmática ou da concentração de sódio em nosso modelo. Além disso, a redução dos níveis de OT poderia estar associada ao aumento da pressão arterial induzido pelo consumo de etanol, uma vez que esse hormônio está relacionado à redução da pressão arterial devido ao aumento da excreção de sódio e potássio.

Diversos estudos da literatura já sugeriram efeito sinérgico da vasopressina e da ocitocina na indução do aumento de AMP_c e da natriurese. Devido a suas semelhanças estruturais, a ocitocina liga-se ao receptor V2 da AVP induzindo a excreção urinária de sódio (FORSLING *et al.*, 1982). Assim, como o modelo de etanol utilizado neste trabalho induziu o aumento plasmático de ANP, justifica-se assim, as reduções plasmáticas de AVP e OT encontradas, corroborando com os achados de Antunes-Rodrigues *et al.* (2004).

A redução nos níveis plasmáticos de AVP e OT induzida pelo consumo crônico de etanol também podem estar associado ao efeito depressor do mesmo sob os receptores de neurotransmissores, incluindo os receptores do GABA e do glutamato, e também sob o sistema dopaminérgico (WANG *et al.*, 1992; RENAUD, 1996; SIGGINS *et al.*, 1999; MELIS *et al.*, 2005). Ao atuar sobre o sistema dopaminérgico, o etanol também é capaz de afetar a síntese e liberação de substâncias estressoras, nas quais podemos destacar a corticosterona (MARINELLI, 2007). A Corticosterona é um hormônio regulado pelo eixo hipotálamo-hipófise e córtex das adrenais de animais. Estudos já demonstraram a interação entre estresse e o consumo de etanol (KREEK; KOOB, 1998; SHAHAM *et al.*, 2000; SINHA, 2001; WISE, 2008). Também já é bem estabelecida na literatura a relação existente entre o aumento dos níveis plasmáticos de corticosterona induzido por modelos experimentais que promovem aumento dos níveis pressóricos (LOU *et al.*, 2001; SINGH *et al.*, 2007; LORENZ *et al.*, 2008). Aguilera *et al.*, (1994) demonstraram que o aumento plasmáticos da ANG II também atua como um fator de síntese e liberação da corticosterona. Assim, em modelos de consumo crônico de etanol atuam favorecem a liberação deste hormônio como resultado de altos níveis plasmáticos de ANG II. Assim, os dados do presente estudo corroboram com os achados descritos anteriormente (FINN *et al.* 2004; RICHARDSON *et al.*, 2008; FORD *et al.*, 2013), pois se observou o aumento dos níveis plasmáticos de corticosterona nos animais tratados cronicamente com etanol.

Como já descrito anteriormente, a ANG II é um dos principais contribuintes para a elevação da pressão arterial sistêmica via ações renais, centrais e vasculares. Outro mecanismo pela qual a ANG II favorece este efeito pressórico é através da produção das espécies reativas de oxigênio (ERO) e seus danos associados (LANDMESSER *et al.*, 2002). A ANG II induz a geração de ERO, sendo este processo dependente da ativação de receptores AT₁ e conseqüente ativação da enzima NAD(P)H oxidase (RAJAGOPALAN *et al.*, 1996; ZAFARI *et al.*, 1998; WARNHOLTZ *et al.*, 1999; TOUYZ; SCHIFFRIN, 2000).

Em condições patológicas estudos já identificaram a contribuição da ERO nos danos promovidos ao sistema cardiovascular. Giustarini *et al.* (2009) identificaram um funcionamento anormal da enzima NAD(P)H oxidase; alteração na atividade catalítica de outras enzimas envolvidas na produção das em condições patológicas. Godin *et al.* (2010) também constataram que tal condição induz a redução na biodisponibilidade e atividade das enzimas antioxidantes, tais como as isoformas da SOD, favorecendo assim o estresse oxidativo e os danos associados à hipertensão arterial sistêmica. Sui *et al.* (2005) observaram uma elevação da pressão arterial associada à redução da capacidade antioxidante em ratos deficientes da isoforma endotelial da SOD. Estudos realizados Rajagopalan *et al.* (1996) já demonstravam uma associação positiva entre o aumento da atividade da enzima NAD(P)H oxidase na aorta torácica de ratos e a geração de ERO. Mollnau *et al.* (2002) observaram um aumento na atividade e expressão da enzima NAD(P)H oxidase, após a administração prévia de ANG II (por sete dias), sugerindo uma associação entre a ANG II e a hipertensão arterial sistêmica. Montezano e Touyz (2012) também constataram um aumento na expressão das isoformas da NAD(P)H oxidase, aumento na atividade oxidase e na geração das ERO em ratos e camundongos tratados com infusão de ANG II. Entretanto, tais resultados apenas sugeriram a associação entre ANG II e a enzima NAD(P)H oxidase para a elevação da pressão arterial.

No presente constatamos que o consumo crônico de etanol ativou o SRA, aumentou os níveis plasmáticos de ANG II, que ao atuar sob o receptor AT₁, induziu o aumento o nível sistêmico das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico; o aumento a atividade da enzima NAD(P)H oxidase e a conseqüente produção de O₂⁻ (artéria aorta torácica e leito arterial mesentérico), além da alteração da capacidade antioxidante total, indicando a presença de estresse oxidativo sistêmico induzido pelo etanol, concordando com os resultados obtidos por Rajagopalan *et al.* (1996); Fukui *et al.* (1997); Landmesser *et al.* (2002); Mollnau *et al.* (2002); Münzel *et al.* (2002); Sato *et al.*, (2003); Dikalova *et al.* (2005); Matsuno *et al.* (2005); Weber *et al.* (2005); Husain *et al.* (2007); Lavi *et al.* (2008); Yogi *et al.* (2010); Das

et al. (2009); Das e Mukherjee (2010); Niu *et al.* (2010); Husain *et al.* (2010) e Husain *et al.* (2011). Uma vez que o tratamento com losartan preveniu o aumento do estresse oxidativo sistêmico associado ao consumo de etanol, destaca-se a participação da ANG II nessa resposta. Porém, não houve alteração na atividade sistêmica total da SOD e consequentemente, não se alterou nos níveis plasmáticos de H₂O₂. Tais dados foram semelhantes aos encontrados por Giustarini *et al.* (2009); Godin *et al.* (2010); Sui *et al.* (2005)

O controle da expressão protéica da NOX1 pela ANG II e sua ação na produção das ERO, no modelo utilizado neste estudo, também pode ser observada pelo aumento significativo da expressão protéica da mesma em aorta dos animais tratados com etanol, onde o tratamento com losartan preveniu este efeito. Assim, este dado concorda com o encontrado por Lassegue *et al.*, 2001, que observaram um aumento na expressão da NOX 1 em animais tratados com ANG II e com Oudot *et al.* (2006) e Richard *et al.* (2008) que também constataram o aumento na expressão e atividade da NOX1 e conseqüente aumento na formação das ERO, tanto em células endoteliais quanto em células da musculatura lisa, em modelo que ativava o SRA. Nosso resultado, também foi semelhante ao descrito por Yang *et al.* (2012) que verificaram que o consumo crônico de etanol favoreceu o aumento da ANG II, que ao atuar em AT₁ induziu a ativação da NOX1 e um conseqüente aumento de ERO.

O estresse oxidativo também está associado à redução da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) e à disfunção endotelial (BRIONES; TOUYZ, 2010).

A disfunção endotelial e a biodisponibilidade de NO tem sido documentadas como fatores de risco associados às doenças cardiovasculares, tais como a HAS (SCHLAICH *et al.*, 2004; YANG *et al.*, 2007). Estudos descrevem as possíveis causas desta disfunção, onde se inclui, principalmente, a redução na síntese de NO; e o desacoplamento da NO sintase na produção das ERO (BRIONES; TOUYZ, 2010).

O NO é um importante mediador liberado pelas células endoteliais e é produzido por ação das isoformas da óxido nítrico sintase (NOS), as quais convertem a L-arginina e a molécula de oxigênio em L-citrulina e NO, utilizando como co-fatores a tetrahydrobiopterin (BH₄) (BRIONES; TOUYZ, 2010). Em condições patológicas como o consumo crônico de etanol, estudos como o de Husain *et al.* (2007, 2010) demonstram alterações na síntese de NO. Nestes trabalhos, os autores constataram uma redução na expressão protéica da eNOS, enquanto observam um aumento da isoforma iNOS em aorta de animais. Entretanto, no presente estudo foi observado apenas o aumento da expressão gênica (artéria aorta torácica e leito arterial mesentérico) das isoformas da sintase de óxido nítrico endotelial (eNOS) e neuronal (nNOS), sendo esta resposta mediada pela ANG II, pois a mesma foi prevenida na

presença do losartan. Não foram observadas alterações na expressão protéica das isoformas da NOS, porém vale-se ressaltar que os dados referem-se apenas a forma total e não a fosforilada das mesmas (resíduos de Ser1177/1179).

O aumento da expressão gênica da eNOS observadas no presente estudo corrobora com os estudos de Cosentino *et al.* (1997) e Drummond *et al.* (2005), onde verificou-se aumento dos níveis de mRNA pela elevação dos níveis de O_2^- em decorrência de estresse oxidativo. Os dados do presente trabalho também concordam com os achados de Hennington *et al.* (1998) e Mollnau *et al.* (2002), que demonstraram o aumento da expressão gênica da eNOS em cultura de células endoteliais e homogenatos de artéria aorta torácica, utilizando o modelo animal de hipertensão pela infusão de ANG II.

Em nosso estudo, também não se observou alteração na expressão gênica ou protéica da Akt, entretanto desse-se ressaltar que a ativação da mesma é transitória, o que poderia dificultar sua detecção (HU *et al.*, 2008). Este dado encontrado em nosso estudo discorda dos resultados por Liu *et al.* (2002) que verificaram uma ativação da Akt, como um efeito protetor mediante um consumo crônico de etanol. Porém, é importante ressaltar que os efeitos do etanol sobre a vasculatura dependem da concentração de etanol utilizada, do tempo de exposição ao etanol e do tipo de vaso estudado (TIRAPELLI *et al.*, 2007).

O consumo crônico de etanol também induz redução do nível plasmático e tecidual de NO, estando essa resposta associada à ação da ANG II (HUSAIN *et al.*, 2008; TODA; AYAJIKI, 2010). Os dados do presente estudo demonstraram uma redução do nitrato plasmático e tecidual (artéria aorta torácica e leito arterial mesentérico) dos animais tratados cronicamente com etanol, concordando com os dados literários descritos anteriormente (HUSAIN *et al.*, 2007, 2010; SHIRPOOR *et al.*, 2012; YOGI *et al.*, 2012). Nossos dados mostram ainda a participação de ANG II nessa resposta, uma vez que o tratamento com o losartan preveniu a redução do nitrato plasmático e tecidual.

Associando os dados da expressão gênica e protéica relatados aos dados da redução biodisponibilidade de NO podemos sugerir alteração entre a produção e disponibilidade de NO induzida pelo consumo crônico de etanol.

Estudos experimentais e clínicos também demonstraram que o consumo crônico de etanol interfere na produção e liberação de NO pelas células endoteliais, reduzindo a biodisponibilidade do NO devido sua reação com o O_2^- , principal tipo de ERO produzida pelo organismo (MOLLNAU *et al.*, 2002). Assim, entende-se que a NAD(P)H oxidase não é a única fonte de ERO durante o estabelecimento da disfunção endotelial.

Nessas condições, o ânion superóxido é capaz de oxidar o BH₄, principal cofator para a formação de NO pela eNOS, e reduzir sua biodisponibilidade (YAN; TIE; MESSINA, 2012). Na ausência de quantidades adequadas de co-fatores, a eNOS pode passar a produzir ERO em maior quantidade que NO. Neste caso, diz-se que a enzima encontra-se desacoplada, uma alusão ao fato de que sua ativação depende do acoplamento entre a ativação de receptores ligados a proteína G e o incremento de Ca²⁺ no interior da célula endotelial. Sob outra perspectiva, pode-se afirmar que, nesta situação, a redução do oxigênio torna-se desacoplada da oxidação de L-arginina que gera NO nos domínios catalíticos da enzima (FORSTERMANN; SESSA, 2012). Forsternann e Sessa (2012) demonstraram que drogas, como o etanol, capazes de interferir no SRA favoreceriam além da disfunção endotelial, o quadro de desacoplamento da eNOS. Tan *et al.* (2012), observaram o processo de desacoplamento da eNOS e produção do peroxinitrito em ratos tratados com etanol, sendo esta resposta prevenida pelo uso do losartan. Assim, se observa a participação da ANG II na resposta em tal evento.

Portanto, a partir do conjunto de dados apresentados (aumento da produção das ERO, redução da capacidade antioxidante, redução da biodisponibilidade de NO e aumento da expressão gênica da eNOS), pode-se sugerir que no presente trabalho, o processo de desacoplamento da eNOS possa estar ocorrendo, porém experimentos adicionais devem ser realizados para tal confirmação.

O presente trabalho demonstrou, como descrito anteriormente, um aumento da produção das ERO e da expressão gênica da nNOS nos animais tratados cronicamente com etanol, sendo estes efeitos mediados pela ANG II, via receptor AT₁. Tais dados podem sugerir efeitos semelhantes àqueles encontrados por Zhang *et al.* (2009), que verificaram utilizando um modelo animal de inibição e deleção genética da nNOS, que essa enzima intensifica o aumento da formação das ERO e fosforilação das MAPKs induzidas pela ANG II. Os autores propuseram que, em condições fisiopatológicas, a nNOS também pode sofrer o processo de desacoplamento, de forma semelhante à eNOS. Assim, este seria um novo mecanismo pelo qual a ANG II favoreceria a hipertensão.

Kahonen *et al.* (1999) demonstraram que o consumo crônico de etanol também é capaz de induzir o processo de estresse oxidativo através da alteração dos mecanismos miogênicos, como por exemplo, pela diminuição no efeito de agentes vasorelaxantes. Os dados do presente estudo mostram que o consumo de etanol não afetou a resposta de relaxamento à acetilcolina e ao NPS. A não alteração da resposta relaxante do NPS, um doador de NO, sugere que o consumo de etanol não afeta a via do NO-GMPc

(RAJAGOPALAN *et al.*, 1996; MOLLNAU *et al.*, 2002). Entretanto, estudos como o de Tirapelli *et al.* (2007) também demonstraram uma redução do relaxamento da acetilcolina pelo tratamento com etanol 20% em leito mesentérico de rato. Husain *et al.* (2008) mostraram redução na resposta da acetilcolina em aorta de ratos tratados com etanol 20% durante 12 semanas e Abou-Agag *et al.* (2005) mostraram a mesma resposta em ratos tratados com solução de etanol 18% durante 8 semanas.

Suzuki *et al.* (2005) e Hunyady e Catt (2006) realizaram um estudo clínico nas quais observaram que a superestimulação do SRA ou o aumento da responsividade à ANG II são vias que iniciam e propagam eventos patológicos, como o da hipertensão arterial sistêmica (HAS). Um dos mecanismos envolvidos na mediação dos efeitos patológicos da HAS refere-se à ação da ANG II via receptor AT₁, na ativação das MAPKs, incluindo principalmente a p38MAPK, JNK/SAPK e ERK 1/2 (TOUYZ; SCHIFFRIN, 2000).

A via pela qual ANG II, via receptor AT₁, ativa a ERK1/2 já está bem estabelecida na literatura científica. A ativação da ERK1/2 pela ANG II já está bem elucidada nos modelos de hipertensão arterial (ISHIDA *et al.*, 1998, 1999). Porém, a ativação da ERK1/2 pela ANG II parece ser um processo redox-independente (TOUYZ *et al.*, 1999).

Como já bem elucidado, o consumo crônico de etanol representa um modelo experimental que favorece o desenvolvimento da hipertensão arterial. No modelo de consumo crônico de etanol utilizado no presente estudo, como descrito anteriormente, foi observado um aumento nos níveis plasmáticos de ANG II. A ANG II formada, ao atuar em AT₁, não afetou a expressão gênica da ERK1/2, entretanto foi capaz de favorecer a ativação/fosforilação da ERK1/2 nos animais tratados com etanol, sendo esta resposta prevenida pelo uso do losartan. Sugere-se que tal resposta tenha ocorrido por meio de um mecanismo redox-independente. Este dado corrobora com o estudo de Touyz *et al.* (1999); Weng e Shukla (2003); e Sharma *et al.* (2012), onde constataram um aumento significativo na fosforilação da ERK1/2, em ratos.

A estimulação da ERK1/2 pela ANG II resulta na subsequente estimulação da JNK/SAPK, que regulam o crescimento celular da musculatura lisa vascular (TOUYZ *et al.*, 1999). A ANG II também pode fosforilar e ativar a p38MAPK, a que atua na importante via da resposta inflamatória associada à hipertensão. No sistema cardiovascular a p38MAPK também atua na hipertrofia cardíaca e no remodelamento induzido pela hipertensão. Uchio-Fukai *et al.* (1998) constataram que a MAPKp38 pode atuar como um regulador negativo da ERK1/2. Assim, a ANG II é capaz de mediar a ativação da p38MAPK por meio das ERO (principalmente, o H₂O₂) produzidas pela NAD(P)H oxidase (TOUYZ *et al.*, 2004). Em

adição, a p38MAPK também atua na ativação da Akt via ANG II. Neste sentido, posteriormente à ativação da ERK1/2, constatamos que houve aumento da expressão gênica da JNK/SAPK nos animais do grupo etanol e sendo esta resposta prevenida pelo uso do losartan, porém não foi observada alteração em relação à expressão gênica da JNK/SAPK. A expressão gênica da p38MAPK foi observada somente em homogenato de leito arterial mesentérico e a expressão protéica deverá ainda ser avaliada. Tais dados discordaram dos achados de Yogi *et al.* (2012), onde utilizando um modelo agudo de etanol, demonstraram o aumento da expressão protéica da p38 e JNK/SAPK induzida pelo etanol e a prevenção desta resposta no tratamento com losartan. É importante ressaltar que a ativação da JNK/SAPK e da p38MAPK é dependente de mecanismos redox-sensíveis, envolvendo principalmente o H₂O₂. Assim, como sugerido a ocorrência de um desacoplamento da eNOS e conseqüente formação de peroxinitrito, acreditamos ocorrer prejuízo nos níveis de H₂O₂ e nos mecanismos onde o mesmo atua, tal como o mecanismo envolvido na fosforilação da p38 e JNK/SAPK. Além disso, condições fisiopatológicas que levam à redução do NO, podem atuar dificultando a ativação das MAPKs (WANG; MURPHY, 1998).

O aumento na atividade das MAPKs contribui não só para a resposta de crescimento e proliferação celular, mas também favorece o aumento na contractilidade vascular induzido pela hipertensão, induzida pelo etanol (TOUYZ *et al.*, 1999). Como descrito, o consumo crônico de etanol é capaz de induzir o processo de estresse oxidativo, e associado a ele também se observa alteração dos mecanismos miogênicos que envolvem o aumento da reatividade vascular para agentes vasoconstritores (PINARDI *et al.*, 1992).

Em relação às alterações nas respostas contráteis induzidas pelo etanol, estudos já demonstraram um favorecimento da resposta contrátil aos agonistas dos α_1 -adrenoceptores, tais como a fenilefrina. Em nosso estudo, constatamos um aumento da resposta contrátil máxima pela fenilefrina tanto em anéis com como sem endotélio. O losartan preveniu o aumento da contração à fenilefrina induzida pelo etanol. Assim, nossos dados sugerem uma participação da ANG II, via receptores AT₁, sobre a ação do etanol na reatividade vascular. Efeito semelhante foi descrito por Pinardi *et al.* (1992) onde demonstraram que o consumo crônico de etanol aumenta a resposta contrátil da fenilefrina em anéis de aorta com endotélio ou sem endotélio. Dados prévios de nosso laboratório demonstraram que o tratamento com etanol aumenta a resposta contrátil à fenilefrina em leito mesentérico de ratos tratados com etanol, sendo essa resposta dependente do endotélio (TIRAPELLI *et al.*, 2008). Utilizando o mesmo modelo experimental de consumo de etanol, Tirapelli *et al.* (2006) mostraram que o aumento da contração à fenilefrina em aorta, induzida pelo consumo de etanol, não é

dependente do endotélio e está relacionado ao aumento do influxo de Ca^{2+} extracelular mediado pelo tromboxano A_2 . Foi observado ainda que a indometacina, um inibidor não seletivo das ciclooxigenases reverteu o aumento de contração à fenilefrina induzida pelo etanol, sugerindo a participação dessas enzimas nessa resposta.

A HAS também é considerada um processo inflamatório crônico nas quais se observa uma elevação de citocinas pró-inflamatórias plasmáticas e aumento da expressão vascular da COX2. Assim, o processo hipertensivo pode ser favorecido pelo aumento da expressão vascular de COX2 (ÁLVAREZ *et al.*, 2007). Tal processo está bem associado com as alterações vasculares onde intensifica as respostas contráteis de diversos agonistas (SCHIFFRIN; TOUYZ, 2000).

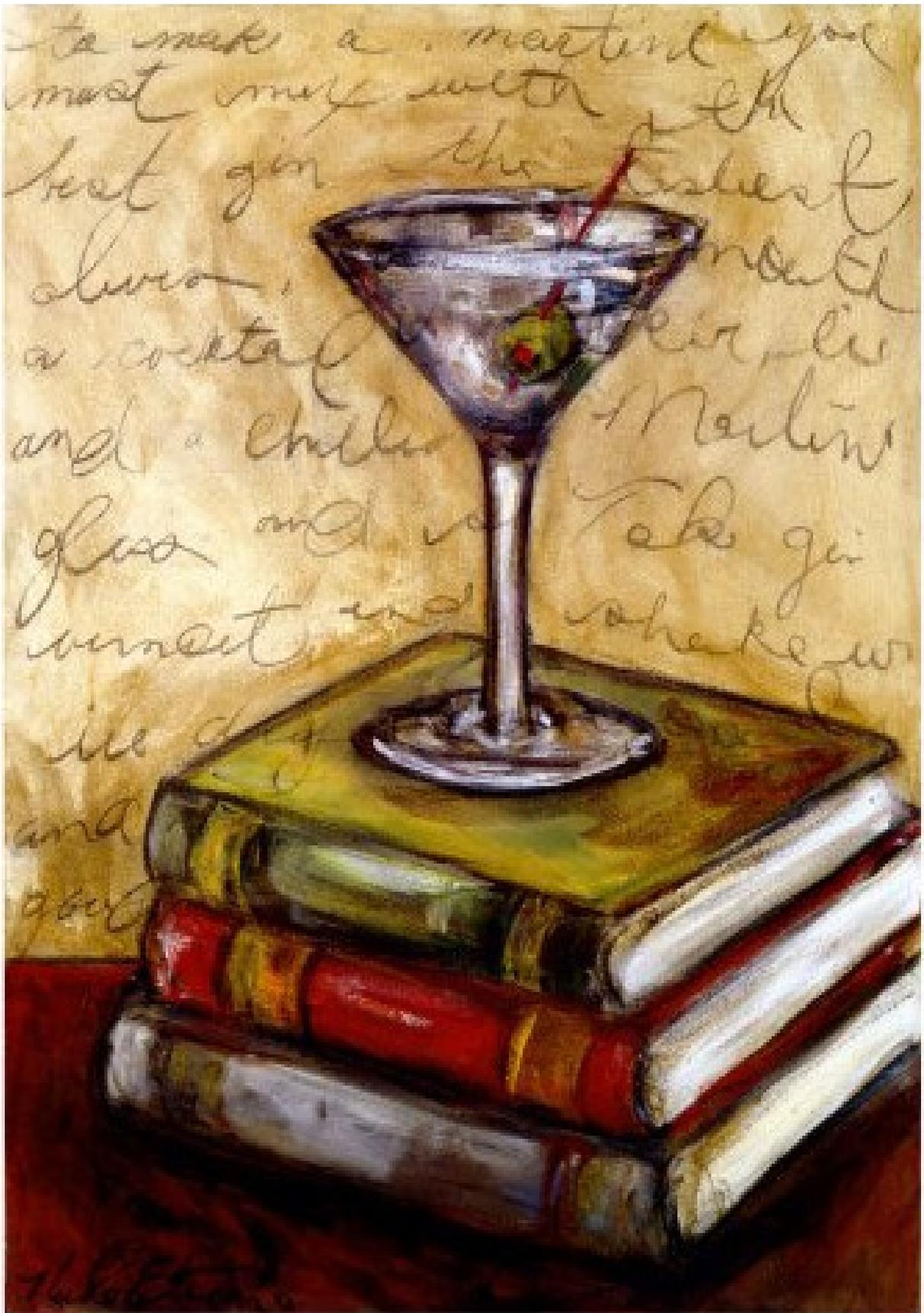
Álvarez *et al.* (2007) demonstraram que a ANG II estimula a liberação de prostaglandinas em vários tipos de células, incluindo as células da musculatura lisa vascular, através da ativação da fosfolipase A_2 . Em adição, os autores mostraram que a ANG II regula a expressão da COX2 e a produção de prostanóides nas células da musculatura lisa vascular de ratos via receptor AT_1 (HU *et al.*, 2002). Assim, a ANG II via receptor AT_1 , está envolvida na intensificação da contração à fenilefrina mediada pelo aumento da expressão da ciclooxigenase-2 (COX2) e da produção de tromboxano A_2 em aorta de ratos. Verificou-se também, que a ANG II é capaz de modular a expressão gênica e protéica da COX2 em ratos hipertensos, sendo tal resposta prevenida pelo tratamento com losartan (HU *et al.*, 2002). Perfis de resposta semelhantes também foram observados no modelo de HAS induzida pelo consumo crônico de etanol (HUSAIN *et al.*, 2011). Tal mecanismo pode estar ocorrendo em nosso modelo de estudo, visto que se observou um aumento significativo da expressão gênica e protéica da COX2 no grupo etanol e sendo esta resposta prevenida pelo tratamento com losartan. Entretanto, estudos complementares devem ser realizados para confirmar essa proposta de mecanismo.



Fonte: Autor desconhecido.

7. CONCLUSÃO

Em suma, os resultados do presente estudo mostram que o consumo crônico de etanol ativa o SRA sistêmico. Em nosso modelo crônico de etanol, a ativação desse sistema foi constatada pelo aumento da atividade da renina e da ECA, além do aumento plasmático de ANG I e ANG II. Assim, considera-se o SRA como o principal mecanismo responsável pelo efeito pressórico observado nos animais tratados com etanol. A ANG II produzida foi capaz de ativar a NAD(P)H oxidase e induzir o aumento tecidual de O_2^- , o aumento da peroxidação lipídica plasmática, além de reduzir a biodisponibilidade plasmática e tecidual do NO, caracterizando a ocorrência de estresse oxidativo sistêmico e tecidual induzido pelo etanol. O tratamento crônico com etanol também afetou mecanismos miogênicos, favorecendo vasoconstrição periférica induzida pela fenilefrina, e alterou mecanismos neuro-humorais envolvidos na regulação da pressão arterial sistêmica. Dessa forma, ao atuar sob o receptor AT_1 , a ANG II desencadeou alterações na expressão gênica e protéica de alguns componentes das vias das MAPKs e das COXs, que em conjunto podem contribuir na elevação da pressão arterial sistêmica decorrentes à exposição crônica ao etanol.



Fonte: Autor desconhecido.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-RAHMAN, A.A.; WOOLLES, W.R. Ethanol induced hypertension involves impairment of baroreceptors. **Hypertension**, v.10, p.1965–73, 1987.

ABOU-AGAG, L.H., KHOO, N.K., BINSACK, R., WHITE, C.R., DARLEY-USMAR, V., GRENETT, H.E., BOOYSE, F.M., DIGERNESS, S.B., ZHOU, F., PARKS, D.A. Evidence of cardiovascular protection by moderate alcohol: role of nitric oxide. **Free Radic. Biol. Med.** v.39, p.540-548, 2005.

AGUIAR, A.S.; DA-SILVA, V.A.; BOAVENTURA, G.T. Can calories from ethanol contribute to body weight preservation by malnourished rats? **Braz J Med Biol Res.**, v.37, p.841–846, 2004.

AGUILERA, G.; YOUNG, W.S.; KISS, A.; BATHIA, A. Direct regulation of hypothalamic corticotrophin releasing hormone neurons by angiotensin II. **Neuroendocrinology**, v.60, p.21, 1994.

ALESSI, D. R.; CUENDA, A.; COHEN, P.; DUDLEY, D. T.; SALTIEL, A. R. PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogenactivated protein kinase kinase in vitro and in vivo. **J Biol Chem.**, v.270, p.27489–27494, 1995.

ALLEN, A.M.; MCKINLEY, M.J.; OLDFIELD, B.J.; DAMPNEY, R.A.; MENDELSON, F.A. Angiotensin II receptor binding and the baroreflex pathway. **Clin Exp Hypertens.**, v.1, p.63-78, 1988.

ALLEN, A.M.; MACGREGOR, D.P.; MCKINLEY, M.J.; MENDELSON, F.A. Angiotensin II receptors in the human brain. **Regul Pept.**, v.79, p.1-7, 1999.

ALTURA, B.M.; ALTURA, B.T. Microvascular and vascular smooth muscle actions of ethanol, acetaldehyde and acetate. **Fed Proc.**, v.41, p.2447-2451, 1982.

ÁLVAREZ, Y.; PÉREZ-GIRÓN, J.V.; HERMANZ, R.; BRIONES, A.M.; GARCÍA-REDONDO, A.; BELTRÁN, A.; ALONSO, M.J.; SALAICES, M. Losartan reduces the increased participation of cyclooxygenase-2-derived products in vascular responses of hypertensive rats. **The Journal of Pharmacol. and Experimental Therapeutics**, v.321, p.381-388, 2007.

ANTUNES-RODRIGUES, J.; DE CASTRO, M.; ELIAS, L.L.; VALENÇA, M.M.; MCCANN, S.M. Neuroendocrine control of body fluid metabolism. **Physiol. Rev.**, v.84, p.169-208, 2004.

BABIOR, B.M. NADPH oxidase. **Curr. Opin. Immunol.**, v.16, n.1, p.42-7, 2004.

BEULENS, J.W.; RIMM, E.B.; ASCHERIO, A.; SPIEGELMAN, D.; HENDRIKS, H.F.; MUKAMAL, K.J. Alcohol consumption and risk for coronary heart disease among men with hypertension. **Ann. Intern. Med.**, v.146, p.10-19, 2007.

BOTELHO, L.M.; BLOCK, C.H.; KHOSLA, M.C.; SANTOS, R.A. Plasma angiotensin(1-7) immunoreactivity is increased by salt load, water deprivation, and hemorrhage. **Peptides**, v.15, p.723-729, 1994.

BLAINE, E.H. Atrial natriuretic factor plays a significant role in body fluid homeostasis, **Hypertension**, p.2-15, 1990.

BRIONES, A.M.; TOUYZ, R.M. Oxidative Stress and Hypertension: Current Concepts. **Curr. Hypertens. Rep.**, v.12, p.135-142, 2010.

CAIRNS, V.; KEIL, U.; KLEINBAUM, D.; DOERING, A.; STIEBER, J. Alcohol consumption as a risk factor for high blood pressure. **Hypertension**, v.6, p.124-131, 1984.

CASTRO, M.; FIGUEIREDO, F.; MOREIRA, A.C. Time-course of hypothalamic CRH and pituitary ACTH contents, and pituitary responsiveness to CRH stimulation after bilateral adrenalectomy. **Horm Metab Res.**, v.27, p.10-15, 1995.

CAT, A.N.; TOUYZ, R.M. A new look at the renin-angiotensin system-Focusing on the vascular system. **Peptides**, v.32, p.2141-2150, 2011.

CHAN, T.C.K.; WALL, R.A.; SUTTER, M.C. Chronic ethanol consumption, stress, and hypertension. **Hypertension**, v.7, p.519-524, 1985.

CHENG, C.P.; CHENG, H.J.; CUNNINGHAM, C. Angiotensin II type 1 receptor blockade prevents alcoholic cardiomyopathy. **Circulation**, v.11, p.544-554, 2006.

CHRISTEN, Y.; WAEBER, B.; NUSSBERGER, J.; PARCHET, M.; BORLAND, R.M.; LEE, R.J.; MAGGON, K. SHUM, L.; TIMMERMANS, P.B.M.W.M.; BRUNNER, H.R. Oral administration of DuP 753, a specific angiotensin II receptor antagonist, to normal male volunteers. **Circulation**, v.83, p.1333-1342, 1991.

CLARCK, L.T. Alcohol induced hypertension: mechanisms, complications, and clinical implications. **J Natl Med Assoc.**, v.77, p.385-389, 1985.

COLANTONIO, D.; CASALE, R.; DESIATI, P.; DE MICHELE, G.; MAMMARELLA, M.; PASQUALETTI, P. A possible role of atrial natriuretic peptide in ethanolinduced acute diuresis. **Life Sci.**, v.48, p.635-642, 1991.

COLLINS, G.B.; BROSNIHAN, B.; ZUTI, R.A. *et al.* Neuroendocrine, fluid balance, and thirst responses to alcohol in alcoholics. **Alcohol Clin Exp Res.**, v.16, p.228–233, 1992.

COSENTINO, F.; HISHIKAWA, K.; KATUSIC, Z.S.; LUSCHER, T.F. High glucose increases nitric oxide synthase expression and superoxide anion generation in human aortic endothelial cells. **Circulation**, v.96, p.25-28, 1997.

COWLEY, A.W. JR.; ROMAN, R.J. Control of blood and extracellular volume. **Baillieres Clin Endocrinol Metab.**, v.3, p.331-369, 1989.

DAS, S.K.; MUKHERJEE, S. Long-term ethanol consumption leads to lung tissue oxidative stress and injury. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v.6, p.414-420, 2010.

DAS, S.K.; L, D.; VARADHAN, S.; MUKHERJEE, S.; VASUDEVAN, D.M. effects of chronic ethanol consumption in blood: a time dependent Study on rat. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v.24, p.301-306, 2009.

DE NICOLA, A.F.; GRILLO, C.; GONZÁLEZ, S. Physiological, biochemical and molecular mechanisms of salt appetite control by mineralocorticoid action in brain. **Braz J Med Biol Res.**, v.25, p.1153-1162, 1992.

DI CASTELNUOVO, A.; CONSTANZO, S.; DI GIUSEPPE, R.; DE GAETANO, G.; IACOVIELLO, L. Alcohol consumption and cardiovascular risk: mechanisms of action and epidemiologic perspectives. **Future Cardiol.**, v.5, p.467-477, 2009.

DIETZ, J.R. Mechanisms of atrial natriuretic peptide secretion from the atrium. **Cardiovasc. Res.**, v.69, p.8-17, 2005.

DIKALOVA, A.; CLEMPUS, R.; LASSEGUE, B.; CHENG, G.; MCCOY, J.; DIKALOV, S.; SAN, MARTIN, A.; LYLE, A.; WEBER, D.S.; WEISS, D.; TAYLOR, W.R.; SCHMIDT, H.H.; OWENS, G.K.; LAMBETH, J.D.; GRIENGLING, K.K. Nox1 overexpression potentiates angiotensin II-induced hypertension and vascular smooth muscle hypertrophy in transgenic mice. **Circulation**, v.112, p.2668-2676, 2005.

DJOUSSÉ, M.D.; HUNT, S.C.; ECKFELDT, J.H.; ARNETT, D.K.; PROVINCE, M.A.; ELLISON, R.C. Alcohol Consumption and Plasma Atrial Natriuretic Peptide (from The HyperGEN Study). **Am. J. Cardiol.**, v.98, p.628-632, 2006.

DRUMMOND, G.R.; CAI, H.; DAVIS, M.E.; RAMASAMY, S.; HARRISON, D.G. Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression by hydrogen peroxide. **Circ Res.**, v.86, p.347-354, 2000.

FAVATA, M. F.; HORIUCHI, K. Y.; MANOS, E. J.; DAULERIO, A. J.; STRADLEY, D. A.; FEESER, W. S.; VAN DYK, D. E.; PITTS, W. J.; EARL, R. A.; HOBBS, F.; COPELAND, R. A.; MAGOLDA, R. L.; SCHERLE, P. A.; TRZASKOS, J. M. Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. **J Biol Chem.**, v.273, p.18623–18632, 1998.

FINN, D.A.; SINNOTT, R.S.; FORD, M.M.; LONG, S.L.; TANCHUCK, M.A.; PHILLIPS, T.J. Sex differences in the effect of ethanol injection and consumption on brain allopregnanolone levels in C57BL/6 mice. **Neuroscience**, v.123, p.813-819, 2004.

FORD, M.M.; STEELE, A.M.; MCCRACKEN, A.D.; FINN, D.A.; GRANT, K.A. The relationship between adjunctive drinking, blood ethanol concentration and plasma corticosterone across fixed-time intervals of food delivery in two inbred mouse strains. **Psychoneuroendocrinology**, v.38, p.2598-2610, 2013.

FORSLING, M.L.; BRIMBLE, M.J.; BALMENT, R.J. The influence of vasopressin on oxytocin-induced changes in urine flow in the male rat. **Acta Endocrinol.**, v.100, v.216–220, 1982.

FORSTERMANN, U.; SESSA, W.C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **European Heart Journal**, v.33, p.829-837, 2012.

FRITZ, M.; RINALDI, G. Blood pressure measurement with the tail-cuff method in Wistar and spontaneously hypertensive rats: influence of adrenergic- and nitric oxide-mediated vasomotion. **J. Pharmacol. Toxicol. Methods.**, v.58, p.215–221, 2008.

FUCHS, F.D., CHAMBLESS, L.E., WHELTON, P.K., NIETO, F.J., HEISS, G. Alcohol consumption and the incidence of hypertension. The atherosclerosis risk in communities study. **Hypertension**, v.37, p.1242-50, 2001.

FUKUI, T.; ISHIZAKA, N.; RAJAGOPALAN, S.; LAURSEN, J.B.; CAPERS, Q.; TAYLOR, W.R.; HARRISON, D.G.; DE LEON, H.; WILCOX, J.N.; GRIENDLING, K.K. p22phox mRNA expression and NADPH oxidase activity are increased in aortas from hypertensive rats. **Circ. Res.**, v.80, p. 45-51, 1997.

GIANOULAKIS, C.; GUILLAUME, P.; THAVUNDAYIL, J.; GUTKOWSKA, J. Increased plasma atrial natriuretic peptide after ingestion of low doses of ethanol in humans. **Alcohol Clin. Exp. Res.**, v.21, p.162-170, 1997.

GILL, K.; AMIT, Z.; SMITH, B.R. Alcohol as a food: a commentary on Richter. **Physiol Behav.**, v.60, p.1485–1490, 1996.

GIUSTARINI, D.; DALLE-DONNE, I.; TSIKAS, D.; ROSSI, R. Oxidative stress and human diseases: Origin, link, measurement, mechanisms, and biomarkers. **Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.**, v.46, p.241-281, 2009.

GOA, K.L.; WAGSTAFF, A.J. Losartan Potassium: A review of its pharmacology, clinical efficacy and tolerability in the management of hypertension. **Drugs**, v.51, p.820-845, 1996.

GODIN, N.; LIU, F.; LAU, G.J.; BREZNICEANU, M.L.; CHÉNIER, I.; FILEP, J.G.; INGELFINGER, J.R.; ZHANG, S.L. CHAN. J.S. Catalase overexpression prevents hypertension and tubular apoptosis in angiotensinogen transgenic mice. **Kidney Int.**, v.77, p.1086-1097, 2010.

GRADMAN, A.H.; ARCURI, K.E.; GOLDBERG, A.I. A randomized, placebo-controlled, double-blind study of various doses of losartan potassium compared with enalapril maleate in patients with essential hypertension. **Hypertension**, v.25, p.1345-1350, 1995.

GUILLAUME, P.; GUTKOWSKA, J.; GIANOULAKIS, C. Increased plasma atrial natriuretic peptide after acute injection of alcohol in rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.271, p.1656-1665, 1994.

GUTKOWSKA, J.; THIBAUT, G.; JANUSZEWICZ, P.; CANTIN, M.; GENEST, J. Direct radioimmunoassay of atrial natriuretic factor. **Biochem Biophys Res Commun.**, v.122, p.593-601, 1984.

HARDING, A.J.; NG, J.L.F.; HALLIDAY, G.M.; OLIVER, J. Comparison of the number of vasopressin-producing hypothalamic neuron in rats and humans. **J. Neuroendocr**, v.7, p.629-636, 1995.

HAANWINCKEL, M.A.; ELIAS, L.K.; FAVARETTO, A.L.; GUTKOWSKA, J.; MCCANN S.M.; ANTUNES- RODRIGUES, J. Oxytocin mediates atrial natriuretic peptide release and natriuresis after volume expansion in the rat. **Proc Natl Acad Sci.**, v.92, p.7902-7906, 1995.

HATTON, D.C., BUKOSKI, R.D., EDAGR, S., MCCARRON, D.A.J. Chronic alcohol consumption lowers blood pressure but enhances vascular contractility in Wistar rats. **Hypertension**, v.10, p.529-37, 1992.

HENNINGTON, B.S.; ZHANG, H.; MILLER, M.T.; GRANGER, J.P.; RECKELHOFF, J.F. Angiotensin II stimulates synthesis of endothelial nitric oxide synthase. **Hypertension**, v.31, p.283-288, 1998.

HERNANDEZ-HERNANDEZ, R., ARMAS-PADILLA, M.C., ARMAS-HERNANDEZ, M.J., VELASCO, M. The prevalence of hypertension and the state of cardiovascular health in Venezuela and surrounding nations. **Ethn. Dis.**, v.4, n.3, p.398-405, 1998.

HIGASHI, Y.; SASAKI, K.; NAKAGAWA, K. Tetrahydrobiopterin enhances forearm vascular response to acetylcholine in both normotensive and hypertensive individuals. **American Journal of Hypertension**, v.15, p.326-332, 2002.

HIPÓLITO, U.V.; ROCHA, J.T.; MARTINS-OLIVEIRA, A.; TIRAPELLI, D.P.C.; JACOB-FERREIRA, A.; BATALHÃO, E.M.; TANUS-SANTOS, J.E.; CARNIO, E.C.; CUNHA, T.M.; QUEIROZ, R.H.; TIRAPELLI, C.R. Chronic ethanol consumption reduces adrenomedullin-induced relaxation in the isolated rat aorta. **Alcohol**, p.1-10, 2011.

HOLLENBERG, N.K.; FISHER, N.D.L.; PRICE, D.A. Pathways for Angiotensin II generation in intact human tissue: Evidence from comparative pharmacological interruption of the Renin system. **Hypertension**, v.32, p.387-92, 1998.

HOSTETLER, K.Y.; RICHMAN, D.D. Studies on the mechanism of phospholipid storage induced by amantadine and chloroquine in Madin Darby canine kidney cells. **Biochem Pharmacol.**, v.31, p.3795-3799, 1982.

HU, Z.W.; KERB, R.; SHI, X.Y.; WEI-LAVERY, T.; HOFFMAN, B.B. Angiotensin II increases expression of cyclooxygenase-2: implications for the function of vascular smooth muscle cells. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.303, p.563-573, 2002.

HU, Z.; CHEN, J., WEI, Q.; XIA, Y. Bidirectional actions of hydrogen peroxide and endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation and function-co-commitment and interplay of Akt and AMPK. **J. Biol. Chem.**, v.283, p.25256-25263, 2008.

HUNYADY, L.; CATT, K.J. Pleiotropic AT1 receptor signaling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin II. **Mol Endocrinol.**, v.20, p.953-970, 2006

HUSAIN, K.; MEJIA, J.; LALLA, J.; KAZIM, S. Time response of alcohol-induced alterations in BP, nitric oxide and oxidant to antioxidants balance in the plasma of rats. **Exp Clin Cardiol.**, v.9, p.229-234, 2004.

HUSAIN, K.; MEJIA, J.; LALLA, J.; KAZIM, S. Dose response of alcohol-induced changes in BP, nitric oxide and antioxidants in rat plasma. **Pharmacol Res.**, v.51, p.337-343, 2005.

HUSAIN, K., VAZQUEZ, M., ANSARI, R.A., MALAFA, M.P., LALLA, J. Chronic alcohol-induced oxidative endothelial injury relates to angiotensin II levels in the rat. **Mol. Cell Biochem.**, v.307, n.1-2, p.51-8, 2008.

HUSAIN, K.; FERDER, L.; ANSARI, R.A.; LALLA, J. Chronic ethanol ingestion induces aortic inflammation/oxidative endothelial injury and hypertension in rats. **Hum. Exp. Toxicol.**, v.30, p. 930–939, 2011.

IBSEN, H., CHRISTENTENSEN, N.J., RASMUSSEN, S., HOLLNAGEL, H., NIELSEN, M.D., GIESE, J. Effects of high alcohol intake on blood pressure, adrenergic activity, and the renin-angiotensin system. **J. Clin. Lab. Inv.**, suppl.174-176, p.87-91, 1985.

ISHIDA, M., ISHIDA, T., THOMAS, S.M., BERK, B.C. Activation of extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2) by angiotensin II is dependent on c-Src in vascular smooth muscle cells. **Circ. Res.**, v. 82, p.7-12, 1998.

ISHIDA, T.; ISHIDA, M.; SUERO, J.; TAKAHASHI, M.; BERK, B.C. Agoniststimulated cytoskeletal reorganization and signal transduction at focal adhesions in vascular smooth muscle cells require c-Src. **J Clin Invest.**, v.103, p.789–797, 1999.

ISHIZAWA, H.; DAVE, J.R.; LIU, L.; TABAKOFF, B.; HOFFMAN, P.L. Hypothalamic vasopressin mRNA levels in mice are decreased after chronic ethanol ingestion. **Eur. J. Pharmac.**, v.189, p.119-127, 1990.

ISRAEL, A. & SOSA-CANACHE, B. Angiotensin II supports sympathetically mediated vasopressor response to footshock-stress. **J. Human Hyperten.**, v.16, p.S84–S88, 2002.

JANKOWSKI, M.; WANG, D.; HAJJAR, F.; MUKADDAM-DAHER, S.; MCCANN, S.M.; GUTKOWSKA, J. Oxytocin and its receptors are synthesized in rat vasculature. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.97, p.6207-6211, 2000.

JAMISON, R.L.; CANAAN-KUHL, S.; PRATT, R. The natriuretic peptides and their receptors. **Am. J. Kidney Dis.**, v.20, p.519, 1992.

KÄHÖNEN, M., KARJALA, K., HUTRI-KÄHÖNEN, N., WU, X., JAATINEN, P., RIIHIOJA, P., HERVONEN, A., PÖRSTI, I. Influence of chronic ethanol consumption on arterial tone in young and aged rats. **Am. J. Physiol.**, v.276, n.2 (Pt 2), p.H464-71, 1999.

KASCHINA, E.; UNGER, T. Angiotensin AT1/AT2 receptors: regulation, signalling and function. **Blood Press.**, v.12, p.70-88, 2003.

KIM, C. J.; KIM, K. W.; PARK, J. W.; LEE, J. C.; ZHANG, J. H. Role of tyrosine kinase in erythrocyte lysate-induced contraction in rabbit cerebral arteries. **J Neurosurg.**, v.89, p.289-296, 1998.

KIM, S.; IWAO, H. Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. **Pharmacol Rev.**, v.52, p.11-34, 2000.

KLATSKY, A.L., FRIEDMAN, G.D., SIEGELAND, A.B., GERARD, M.J. Alcohol consumption and blood pressure. **N. Engl. J. Med.**, v.296, p.1194-1200, 1977.

KLATSKY, A.L., FRIEDMAN, G.D., ARMSTRONG, M.A. The relationships between alcoholic beverage use and other traits to blood pressure: a new Kaiser Permanente study. **Circulation**, n.73, p.628-36, 1986.

KREBS, M.O.; KRÖHN, T.; BOEMKE, W.; MOHNAUOT, R.; KACZMARCZYK, G. Renal and hemodynamic effects of losartan in conscious dogs controlled mechanical ventilation. **Am. J. Physiol.**, v.276, p.425-432, 1999.

KREEK, M.J.; KOOB, G.F. Drug dependence: stress and dysregulation of brain reward pathways. **Drug Alcohol Depend.**, v.51, p.23-47, 1998.

LAGAUD, G. J.; LAM, E.; LUI, A.; VAN BREEMEN, C.; LAHER, I. Nonspecific inhibition of myogenic tone by PD98059, a MEK1 inhibitor, in rat middle cerebral arteries. **Biochem Biophys Res Commun.**, v.257, p.523-527, 1999.

LANDMESSER, U.; CAI, H.; DIKALOV, S.; MCCANN, L.; HWANG, J.; JO, H.; HOLLAND, S.M.; HARRISON, D.G. Role of p47 (phox) in vascular oxidative stress and hypertension caused by angiotensin II. **Hypertension**, v.40, p.511-515, 2002.

LANDMESSER, U.; DIKALOV, S.; PRICE, S.R. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. **Journal of Clinical Investigation**, v.111, p.1201-1209, 2003.

LARAGH, J.H.; ANGERS, M.; KELLY, W.G.; LIEBERMANN, S. Hypotensive agents and pressor substances. The effect of epinephrine, norepinephrine, angiotensin II and others on the secretory rate of aldosterone in man. **JAMA**, v.174, 234-240, 1960.

LASSEGUE, B.; SORESCU, D.; SZOCS, K.; YIN, Q.; AKERS, M.; ZHANG, Y.; GRANT S.L.; LAMBETH, J.D.; GRIENDLING, K.K. Novel gp91(phox) homologues in vascular smooth muscle cells: nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways. **Circ Res.**, v.88, p.888-894, 2001.

LAVI, S.; YANG, E.H.; PRASAD, A.; MATHEW, V.; BARSNESS, G.W.; RIHAL, C.S.; LERNAN, L.O.; LERNAN, A. The interaction between coronary endothelial dysfunction, local oxidative stress, and endogenous nitric oxide in humans. **Hypertension**, v.51, p.127-133, 2008.

LAURE-ACHAGIOTIS, C.; POUSSARD, A.M.; LOUI-SYLVESTRE, J. Alcohol drinking, food and fluid intakes and body weight gain in rats. **Physiol Behav.**, v.47, p.545-548, 1990.

LAURSEN, J.B.; RAJAGOPALAN, S.; GALIS, Z.; TARPEY, M.; FREEMAN, B.A.; HARRISON, D.G. Role of superoxide in angiotensin II-induced but not catecholamine-induced hypertension. **Circulation**, v.95, p.588-593, 1997.

LI, J.M., SHAH, A.M. Mechanism of endothelial cell NADPH oxidase activation by angiotensin II. Role of the p47phox subunit. **J. Biol. Chem.**, v.278, n.14, p.12094-100, 2003.

LIAN, C. L'alcoolisme, cause d'hypertension arterielle. **Acad. Natl. Med.**, v.74, p.525-28, 1915.

LINKOLA, J.; FYHRQUIST, F.; YLIKABRI, R. Renin, aldosterone and cortisol during ethanol intoxication and hangover. **Acta. Physiol. Scand.**, v.106, p.75-82, 1979.

LINKOLA, J.; TIKKANEN, I.; FYHRQUIST, F.; RUSI, M. Renin, water drinking, salt preference and blood pressure in alcohol preferring and alcohol avoiding rats. **Pharmacol. Biochem. Behav**, v.12, p.293-296, 1980.

LIU, J.; TIAN, Z.; GAO, B.; KUNOS, G. Dose-dependent Activation of Antiapoptotic and Proapoptotic Pathways by Ethanol Treatment in Human Vascular Endothelial Cells. **The journal of biological chemistry**, v.277, p.20927-20933, 2002.

LORENZ, J.N.; LOREAUX, E.L.; DOSTANIC-LARSON, I. *et al.* ACTH-induced hypertension is dependent on the ouabain-binding site of the $\alpha 2$ -Na⁺-K⁺-ATPase subunit. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, v. 295, p.H273–280, 2008.

LOU, Y.; WEN, C.; LI, M. *et al.* Decreased renal expression of nitric oxide synthase isoforms in adrenocorticotropin-induced and corticosterone-induced hypertension. **Hypertension**, v.37, p.1164–1170, 2001.

LUTHER, J.M.; BROWN, N.J. The rennin-angiotensin-aldosterone system and glucose homeostasis. **Trends Pharmacol. Sci.**, v.32, p.734-739, 2011.

MACMAHON, S. Alcohol consumption and hypertension. **Hypertension**, v.9, n.2, p.111-21, 1987.

MARINELLI, M. Dopaminergic reward pathways and effects of stress. In: al'Absi, M., editor. *Stress and Addiction: Biological and Psychological Mechanisms*. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science; 2007. p. 41-83.

MATSUNO, K.; YAMADA, H.; IWATA, K.; JIN, D.; KATSUYAMA, M.; MATSUKI, M.; TAKAI, S.; YAMANISHI, K.; MIYAZAKI, M.; MATSUBARA, H.; YABE-NISHIMURA, C. Nox1 is involved in angiotensin II-mediated hypertension: a study in Nox1-deficient mice. **Circulation**, v.112, p.2677-2678, 2005.

MELIS, M.; SPIGA, S.; DIANA, M. The dopamine hypothesis of drug addiction: hypodopaminergic state. **Int.Rev.Neurobiol.**, v.63, p.101-154, 2005.

MILLERCHOEN, N.R.; RIGGS, D.S. Homeostatic control of plasma osmolality in the dog and the effect of ethanol. **Am J Physiol.**, v. 217, p.431-437, 1969.

MILON, H., FROMENT, A., GASPARD, P., GUIDOLLET, J., RIPOLE, J.P. Alcohol consumption and blood pressure in a French epidemiological study. **Eur. Heart J.**, v.3, p.59-64, 1982.

MOLLNAU, H.; WENDT, M.; SZOCS, K.; LASSEGUE, B.; SCHULZ, E.; OELZE, M.; LI H.; BODENSCHATZ, M.; AUGUST, M.; KLESCHYOV, A.L.; TSILIMINGAS, N.; WALTER, U.; FORSTERMANN, U.; MEINERTZ, T.; GRIENDLING, K.; MUNZEL, T. Effects of angiotensin II infusion on the expression and function of NAD(P)H oxidase and components of nitric oxide/cGMP signaling. **Circ. Res.**, v.20, p.58-65, 2002.

MONTEZANO, A.C.; TOUYZ, R.M. Oxidative stress, Noxs, and hypertension: Experimental evidence and clinical controversies. **Annals of Medicine**, v.44, p.2-16, 2012.

MÜNZEL, T.; HINK, U.; HEITZER, T.; MEINERTZ, T. Role for NADPH/NADH Oxidase in the modulation of Vascular Tone. **Annals New York Academy of Sciences**, p.387-400, 2002.

MUSABAYANE, C.T.; NDHLOVU, C.E.; MAMUTSE, G.; BWITITI, G.; BALMENT, R.J. Acute chloroquine administration increases renal sodium excretion. **J Trop Med Hyg.**, v.96, p.305-310, 1993.

MUSABAYANE, C.T.; NDHLOVU, C.E.; FORSLING, M.L.; BALMENT, R.J.. Interaction of aldosterone and oxytocin to influence renal sodium excretion in rats. **Exp Physiol.**, v.79, p.763-774, 1994.

NIU, X.L.; MADAMANCHI, N.R.; VENDROV, A.E.; TCHIVILEV, I. ROJAS, M.; MADAMANCHI, C.; BRANDES, R.P.; KRAUSE, K.H.; HUMPHRIES, J.; SMITH, A.; BURNAND, K.G.; RUNGE, M.S. Nox activator 1: a potential target for modulation of vascular reactive oxygen species in atherosclerotic arteries. **Circulation**, v.121, p.549-559, 2010.

O'KEEFE, J.H.; BYBEE, K.A.; LAVIE, C.J. Alcohol and cardiovascular health: the razor-sharp double-edged sword. **J Am Coll Cardiol.**, v.50, p. 1009-1014, 2007.

OUDOT, A.; MARTIN, C.; BUSSEUIL, D.; VERGELY, C.; DEMAISON, L.; ROCHETTE, L. NADPH oxidases are in part responsible for increased cardiovascular superoxide production during aging. **Free Radic Biol Med.**, v.40, p.2214–2222, 2006.

PALS, D.T.; COUH, S.J., Renin release induced by losartan (DuP 753), an angiotensin II receptor antagonist. **Clin. Exp. Hypertens.**, v.15, p.1-13, 1993.

PAXTON, W.G., MARRERO, M.B., KLEIN, J.D., DELAFONTAINE, P., BERK, B.C., BERNSTEIN, K.E. The angiotensin II AT1 receptor is tyrosine and serine phosphorylated and can serve as a substrate for the src family of tyrosine kinases. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.200, p.260-67, 1994.

PHILLIPS, M.I., SPEAKMAN, E.A., KIMURA, B. Levels of angiotensin and molecular biology of the tissue renin angiotensin systems. **Regul. Pept.**, v.43, p.1-20, 1993.

PINARDI, G., BRIEVA, C., VINET, R. PENNA, M. Gen. Effects of chronic ethanol consumption on -adrenergic-induced contractions in rat thoracic aorta. **Pharmacol.**, v.23, n.2, p.245-8, 1992.

POLIKANDRIOTIS, J.A., RUPNOW, H.L., ELMS, S.C., CLEMPUS, R.E., CAMPBELL, D.J., SUTLIFF, R.L., BROWN, L.A., GUIDOT, D.M., HART, C.M. Chronic ethanol ingestion increases superoxide production and NADPH oxidase expression in the lung. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, v.34, n.3, p.314-9, 2006.

RAJAGOPALAN, S.S.; KURZ, S.; MUNZEL, T. Angiotensin II mediated hypertesion in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase

activation: Contribution to alterations of vasomotor tone. **J. Clin. Invest.**, v.97, p.1916-1923, 1996.

RESSTEL, L.B.; TIRAPELLI, C.R.; LANCHOTE, V.L. *et al.* Chronic ethanol consumption alters cardiovascular functions in conscious rats. **Life Sci.**, v.78, p.2179-2187, 2006.

RESSTEL, L.B.; SCOPINHO, A.A.; LOPES, DA SILVA A.; *et al.* Increased circulating vasopressin may account for ethanol-induced hypertension in rats. **Am J Hypertens.**, v.21, p.930-935, 2008.

RICE, K.K.; RICHTER, C.P. Increased sodium chloride and water intake of normal rats treated with desoxycorticosterone acetate. **Endocrinology**, v.33, p.106-115, 1943.

RICHARD, C.; LAUZIER, B.; DELEMASURE, S.; TALBOT, S.; GHIBU, S.; COLLIN, B., *et al.* Effects of angiotensin-1 converting enzyme inhibition on oxidative stress and bradykinin receptor expression during doxorubicin-induced cardiomyopathy in rats. **J Cardiovasc Pharmacol.**, v.52, p.278–285, 2008.

RICHARDSON, H.N.; LEE, S.Y.; O'DELL, L.E.; KOOB, G.F.; RIVIER, C.L. Alcohol self-administration acutely stimulates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, but alcohol dependence leads to a dampened neuroendocrine state. **Eur. J. Neurosci.**, v.28, p.1641-1653, 2008.

ROBERTSON, G.L.; MAHR, E.A.; ATHAR, S.; SINHA, T. Development and clinical application of a new method for the radioimmunoassay of arginine vasopressin in human plasma. **J Clin Invest.**, v.52, p.2340-2352, 1973.

ROCHA, J.T., HIPÓLITO, U.V., MARTINS-OLIVEIRA, A., TIRAPELLI, D.P., BATALHÃO, M.E., CARNIO, E.C., QUEIROZ, R.H., COELHO, E.B., CUNHA, T.M., TANUS-SANTOS, J.E., TIRAPELLI, C.R. Ethanol consumption alters the expression and reactivity of adrenomedullin in the rat mesenteric arterial bed. **Alcohol Alcohol.**, v.47, n.1, p. 9-17, 2012.

SACHINIDIS, A., GOUNI-BERTHOLD, I., SEUL, C., SEEWALD, S., KO, Y., SCHMITZ, U., VETTER, H. Early intracellular signalling pathway of ethanol in vascular smooth muscle cells. **Br. J. Pharmacol.**, v.128, n.8, p.1761-71, 1999.

SANNA, P.P.; FOLSOM, D.P.; BARIZO, M.J.; HIRSCH, M.D.; MELAI, K.R.; MACIEJEWSKI-LENOIR, D.; BLOOM, F.E. Chronic ethanol intake decreases vasopressin mRNA content in the rat hypothalamus: a PCR study. **Molec. Brain Res.**, v.19, p.241-245, 1993.

SATO, A.; SAKUMA, I.; GUTTERMAN, D.D. Mechanism of dilation to reactive oxygen species in human coronary arterioles. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, v.285, p.2345-2354, 2003.

SAUNDERS, J.B.; BEEVERS, D.G.; PATON, A. Alcohol-induced hypertension. **Lancet**, v.2, p.653-656, 1981.

SENTANDREU, M.A.; TOLDRÁ, F. A fluorescence-based protocol for quantifying. **Nat. Protol.**, v.5, p.2423-2427, 2006.

SCHLAICH, M.P.; PARNELL, M.M.; AHLERS, B.A.; FINCH, S.; MARSHALL, T.; ZHANG, W.Z.; KAYE, D.M. Impaired L-arginine transport and endothelial function in hypertensive and genetically predisposed normotensive subjects. **Circulation**, v.110, p.3680-3686, 2004.

SHAHAM, Y.; ERB, S.; STEWART, J. Stress-induced relapse to heroin and cocaine seeking in rats: a review. **Brain Res. Brain Res. Rev.**, v.33, p.13-33, 2000.

SHARMA, A.; SAURABHI, K.; YADAV, S.; JAIN, S.K.; PARMAR, D. Ethanol induced induction of cytochrome P450 2E1 and activation of mitogen activated protein kinases in peripheral blood lymphocytes. **Xenobiotica**, v.42, p.317-326, 2012.

SHIRPOOR, A.; SALAMI, S.; KHADEM-ANSARI, M.H.; HESHMATIAN, B.; ILKHANIZADEH, B. Long-term ethanol consumption initiates atherosclerosis in rat aorta through inflammatory stress and endothelial dysfunction. **Vascular Pharmacology**, v.57, p.72-77, 2012.

SIGGINS, G.R.; NIE, Z.; MADAMBA, S. A metabotropic hypothesis for ethanol sensitivity of GABAergic and glutamatergic central synapses. **Klewer Academic/Plenum**, p.135-143, 1999.

SILVA, T.P.; SILVEIRA, G.A.; FIOR-CHADI, D.R. Effects of ethanol consumption on vasopressin and neuropeptide Y immunoreactivity and mRNA expression in peripheral and central areas related to cardiovascular regulation. **Alcohol**, v.32, p.213-222, 2004.

SILVA, A.L.; RUGINSK, S.G.; UCHOA, E.T.; CRESTANI, C.C.; SCOPINHO, A.A.; CORREA, F.M.A.; DE MARTINIS, B.S.; ELIAS, L.L.K.; RESSTEL, L.B.; ANTUNES-RODRIGUES, J. Time-course of neuroendocrine changes and its correlation with hypertension induced by ethanol consumption. **Alcohol and Alcoholism**, v.1, p.1-10, 2013.

SINGH, R.R.; CULLEN-MCEWEN, L.A.; KETT, M.M. *et al.* Prenatal corticosterone exposure results in altered AT1/AT2, nephron deficit and hypertension in the rat offspring. **J Physiol.**, v.579, p.503–513, 2007.

SINHA, R. How does stress increase risk of drug abuse and relapse? **Psychopharmacology**, v.158, p.343-359, 2001.

SKLIROS, E.A., PAPADODIMA, S.A., SOTIROPOULOS, A., XIPNITOS, C., KOLLIAS, A., SPILIOPOULOU, C.A. Relationship Between Alcohol Consumption and Control of

Hypertension Among Elderly Greeks. The Nemea Primary Care Study. **Hellenic J Cardiol.**, v.53, p.26-32, 2012.

SOKABE, H. Phylogeny of the renal effects of angiotensin. *Kidney International*, v.6, p.263-271, 1974.

STEWART, C.W.; KENNEDY, R.H. Effects of chronic ethanol consumption on aortic constriction in male and female rats. **European Journal of Pharmacology**, v.366, p.55-60, 1999.

STRICKLAND, J.A.; WOOLES, W.R. Effect of acute and chronic ethanol on the agonist responses of vascular smooth muscle. **Eur J Pharmacol.**, v.152, p.83-91, 1988.

SUI, H.; WANG, W.; WANG, P.H.; LIU, L.S. Effect of glutathione peroxidase mimic ebselen (PZ51) on endothelium and vascular structure of stroke-prone spontaneously rats. **Blood Press.**, v.14, p.366-372, 2005.

SUZUKI, H.; MOTLEY, E.D.; FRANK, G.D.; UTSUNOMIYA, H.; EGUCHI, S. Recent progress in signal transduction research of the angiotensin II type-1 receptor: protein kinases, vascular dysfunction and structural requirement. **Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents**, v.3, p.305–322, 2005.

TAKEI, Y. Comparative physiology of body fluid regulation in vertebrates with special reference to thirst regulation. **Jpn J Physiol.**, v.50, p.171-186, 2000.

TAN, Y.; LI, X.; PRABHU, S.D. Angiotensin II plays a critical role in alcohol-induced cardiac nitrate damage, cell death, remodeling, and cardiomyopathy in PKC/NADPH oxidase-dependent manner. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v.59, p.1477-1486, 2012.

TESFAMARIAM, B.; BROWN, M.L.; COHEN, R.A. Elevated glucose impairs endothelium-dependent relaxation by activating protein kinase C. **J Clin Invest.**, v.87, p.1643-1648, 1991.

THEVANANTHER, S.; BRECHER, A.S. Interaction of acetaldehyde with plasma proteins of the rennin-angiotensin system. **Alcohol**, v.11, p.493-499, 1994.

TIRAPELLI, C.R., AL-KHOURY, J., BKAILY, G., D'ORLEANS-JUSTE, P., LANCHOTE, V.L., UYEMURA, S.A., DE OLIVEIRA, A.M. Chronic ethanol consumption enhances phenylephrine-induced contraction in the isolated rat aorta. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.316, p.233-41, 2006a.

TIRAPELLI, C.R., CASOLARI, D.A., YOGI, A., MONTEZANO, A.C., TOSTES, R.C., LEGROS, E., D'ORLEANS-JUSTE, P., LANCHOTE, V.L., UYEMURA, S.A., DE OLIVEIRA, A.M. Chronic ethanol consumption enhances endothelin-1-induced contraction in the isolated rat carotid. **J. Exp. Pharmacol. Ther.** v.318, n.2, p.819-827, 2006b.

TIRAPELLI, C.R., LEONE, A., COELHO, E.B., RESSTEL, L.B., CORREA, F.M.A., LANCHOTE, V., UYEMURA, S., PADOVAN, C.M., DE OLIVEIRA, A.M. Effect of ethanol consumption on blood pressure and rat mesenteric arterial bed, aorta and carotid responsiveness. **J. Pharm. Pharmacol.**, v.59, n.7, p.985-993, 2007.

TIRAPELLI, C.R., LEONE, A.F., YOGI, A., TOSTES, R.C., LANCHOTE, V.L., UYEMURA, S.A., RESSTEL, L.B., CORRÊA, F.M., PADOVAN, C.M., DE OLIVEIRA, A.M., COELHO, E.B. Ethanol consumption increases blood pressure and alters the responsiveness of the mesenteric vasculature in rats. **J. Pharm. Pharmacol.**, v.60, n.3, p.331-41, 2008.

TODA, N.; AYAJIKI, K. Vascular actions of nitric oxide as affected by exposure to alcohol. **Alcohol**, v.45, p.347-355, 2010.

THOMAS, E.L. The sympathetic nervous system and long-term blood pressure regulation. **Heart**, v.14, p.147S-154S, 2001.

TOUYZ, R.M.; HE, G.; DENG, L.Y.; SCHIFFRIN, E.L. Role of extracellular signal-regulated kinases in angiotensin II-stimulated contraction of smooth muscle cells from human resistance arteries. **Circulation.**, v. 99, p.392-399, 1999.

TOUYZ, R.M., SCHIFFRIN, E.L. Signal Transduction Mechanisms Mediating the Physiological and Pathophysiological Actions of Angiotensin II in Vascular Smooth Muscle Cells. **Pharmacol. Rev.**, v.52, n.4, p.639-72, 2000.

TOUYZ, R.M.; CRUZADO, M.; TABET, F.; YAO, G.; SALOMON, S.; SCHIFFRIN, E.L. Redox-dependent MAP kinase signaling by Ang II in vascular smooth muscle cells: role of receptor tyrosine kinase transactivation. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v.81, p.159-167, 2003.

TOUYZ, R.M.; YAO, G.; VIEL, E.; AMIRI, F.; SCHIFFRIN, E.L. Angiotensin II and endothelin-1 regulate MAP kinases through different redox-dependent mechanisms in human vascular smooth muscle cells. **J Hypertens.**, v.22, p.1141–1149, 2004.

TOUYZ, R.M., PARAVICINI, T.M. NADPH Oxidases, Reactive Oxygen Species, and Hypertension: Clinical implications and therapeutic possibilities. **Diabetes Care.**, v.31, p.170-80, 2008.

UTKAN, T.; YILDIZ, F.; ILBAY, G.; OZDEMIRCI, S.; ERDE, B.F.; GACAR, N.; ULAK, G. Blood pressure and vascular reactivity to endothelin-1, phenylephrine, serotonin and acetylcholine following chronic alcohol consumption in vitro. **Fundam. Clin. Pharmacol.**, v.15, p.157-165, 2001.

VANDER, A.J. Chronic effects of lead on the renin-angiotensin system. **Environ Health Perspect**, v.78, p.77–83, 1988.

VIRDIS, A.; DURANTI, E.; TADDEI, S. Oxidative stress and vascular damage in hypertension: Role of Angiotensin II. **Int. J. Hypertens.**, p.1-7, 2011.

WARNHOLTZ, A.; NICKENIG, G.; SCHULZ, E. Increased NADH-oxidase-mediated superoxide production in the early stages of atherosclerosis: evidence for involvement of the rennin-angiotensin system. **Circulation**, v.99, p.2027-2033, 1999.

WANG, X.; TREISTMAN, S.N.; LEMOS, J.R. Two types of high-threshold calcium currents inhibited by omegaconotoxin in nerve terminals of rat neurohypophysis. **Journal of Physiology**, v.445, p.181-199, 1992.

WANG, X.; MURPHY, T.J. Inhibition of cyclic AMP-dependent kinase by expression of a protein kinase inhibitor/enhanced green fluorescent fusion protein attenuates angiotensin II-induced type 1 AT1 receptor mRNA down-regulation in vascular smooth muscle cells. **Mol Pharmacol.**, v.54, p.514–524, 1998.

WATANABE,T.; BARKER, T.A.; BERK, B. Angiotensin II and endothelium: diverse signals and effects. **Hypertension**, v.45, p.163-9, 2005.

WEBER, D.S.; ROCIC, P.; MELLIS, A.M.; LAUDE, K.; LYLE, A.N.; HARRISON, D.G.; GRIENGLING, K.K. Angiotensin II-induced hypertrophy is potentiated in mice overexpressing p22phox in vascular smooth muscle. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, v.288, p.37-42, 2005.

WENG, Y.I.; SHUKLA, S.D. Effects os chronic ethanol treatment on the angiotensin II-mediated p42/44 mitogen-activated protein kinase and phosphorylase *a* activation in rat hepatocytes. **Alcohol**, v.29, p.83-90, 2003.

WILLIAMS, S.P.; ADAMS, R.D.; MUSTAFA, S.J. The effects of chronic ethanol treatment on endothelium-dependent responses in rat thoracic aorta. **Alcohol**, v.7, p.121-127, 1990.

WILSNACK, R; WILSNACK, S.C. Gender and alcohol: individual and social perspectives. **Rutgers Center of Alcohol Studies**: New Brunswick, New Jersey, EUA, p. 504, 1997.

WISE, R.A. Ventral tegmental glutamate: A role in stress-, cue-, and cocaine-induced reinstatement of cocaine-seeking. **Neuropharmacology**, 2008.

XAIO, F.; PUDDEFOOT, J.R.; VINSON, G.P. The expression of rennin and the formation of angiotensin II in bovine aortic endothelial cells. **J. Endocrinol.**, v.164, p.207-214, 2000.

XIN, X.; HE, J.; FRONTINI, M.G.; OGDEN, L.G.; MOTSAMAI, O.I.; WHELTON, P.K. Effects of alcohol reduction on blood pressure: a meta-analysis of randomized controlled trials. **Hypertension**, v.38, p.1112-1117, 2001.

YAN, J.; TIE, G.; MESSINA, L. M. Tetrahydrobiopterin, L-arginine and vitamin C actsynergistically to decrease oxidative stress, increase nitricoxide and improve blood flow after induction of hindlimb ischemia in the rat. **Mol Med.**, v.18, p.676-684, 2012.

YANG, Z.W.; ZHENG, T.; ZHANG, A.; ALTURA, B.T.; ALTURA, B.M. Mechanisms of hydrogen peroxide-induced contraction of rat aorta. **Eur J Pharmacol.**, v.344, p.169-181, 1998.

YANG, Z.W.; ZHENG, T.; WANG, J.; ZHANG, A.; ALTURA, B.T.; ALTURA, B.M. Hydrogen peroxide induces contraction and raises $[Ca^{2+}]_i$ in canine cerebral arterial smooth muscle: participation of cellular signaling pathways. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.**, v.360, p.646-653, 1999.

YANG, Z.W., WANG, J., ZHENG, T., ALTURA, B.T., ALTURA, B.M. Importance of PKC and PI3Ks in ethanol-induced contraction of cerebral arterial smooth muscle. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v.280, n.5, p.H2144-52, 2001a.

YANG, Z.W., WANG, J., ZHENG, T., ALTURA, B.T., ALTURA, B.M. Ethanol-induced contractions in cerebral arteries: role of tyrosine and mitogen-activated protein kinases. **Stroke**, v.32, n.1, p.249-57, 2001b.

YANG, Z.W., WANG, J., ZHENG, T., ALTURA, B.T., ALTURA, B.M. 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**, v.28, n.1, p.17-28, 2002.

YANG, Z.; VENARDOS, K.; JONES, E.; MORRIS, B.J.; CHIN-DUSTING, J.; KAYE, DM. Identification of a novel polymorphism in the 3'UTR of the L-arginine transporter gene SLC7A1: contribution to hypertension and endothelial dysfunction. **Circulation**, v.115, p.1269-1274, 2007.

YANG, B.; TAN, Y.; WANG, B.; MIAO, X.; CHEN, Q.; ZHENG, Y.; CAI, L. Deletion of angiotensin II type 1 receptor gene or scavenger of superoxide prevents chronic alcohol-induced aortic damage and remodeling. **J. Cell. Mol. Med.**, v.16, n.10, p.2530-2538, 2012.

YOGI, A.; CALLERA, G.E.; HIPÓLITO, U.V.; SILVA, C.R.; TOUYZ, R.M.; TIRAPELLI, C.R. Ethanol-induced vasoconstriction is mediated via redox-sensitive cyclo-oxygenase-dependent mechanisms. **Clin. Sci.**, v.118, p.657-668, 2010.

YOGI, A.; CALLERA, G.E.; MECAWI, A.S.; BATALHÃO, M.E.; CARNIO, E.C.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; QUEIROZ, R.H.; TOUYZ, R.M.; TIRAPELLI, C.R. 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.**, p.1-9, 2012.

ZAFARI, A.M., USHIO-FUKAI, M., AKERS, M., YIN, Q., SHAH, A., HARRISON, D.G., TAYLOR, W.R., GRIENGLING, K.K. Novel role of NADH/NADPH oxidase-derived hydrogen peroxide in angiotensin II induced hypertrophy of rat vascular smooth muscle cells. **Hypertension**, v.32, p.488-95, 1998.

ZAFARI, A.M.; USHIO-FUKAI, M.; MINIERI, C.A.; AKERS, M.; LASSEGUE, B.; GRIENGLING, K.K. Arachidonic acid metabolites mediate angiotensin II-induced NADH/NADPH oxidase activity and hypertrophy in vascular smooth muscle cells. **Antioxid Redox Signal**, v.1, p.167-179, 1999.

ZANCHETTI, A.; STELLA, A.; LEONETTI, G.; MORGANTI, A.; TERZOLI, L. Control of renin release: a review of experimental evidence and clinical implications. **Am J Cardiol.**, v.37, p.675-691, 1976.

ZHANG, G.; KIMURA, S.; MURAO, K.; SHIMIZU, J.; MATSUYOSHI, H.; TAKAKI, M. Role of neuronal NO synthase in regulating vascular superoxide levels and mitogen-activated protein kinase phosphorylation. **Cardiovascular Research.**, v.81, p.389-399, 2009.

ZHENG, X. L.; MOKASHI, S.; HOLLENBERG, M. D. Contractile action of ethanol in guinea pig gastric smooth muscle: inhibition by tyrosine kinase inhibitors and comparison with the contractile action of epidermal growth factor-urogastrone. **J Pharmacol Exp Ther.**, v.282, p.485–495, 1997.

VI DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO. **Arq. Bras. Cardiol.**, São Paulo, v. 95, n. 1, 2010.

I DIRETRIZ DE PREVENÇÃO CARDIOVASCULAR. **Arq. Bras. Cardiol.**, São Paulo, v. 101, n. 6, 2013.