UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Carla Brigagão Pacheco da Silva

**Mecanismos da toxicidade renal induzida pelo consumo crônico de etanol:
papel da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS)**

Ribeirão Preto

2020

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Mecanismos da toxicidade renal induzida pelo consumo crônico de etanol:
papel da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS)**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do título de Doutor em para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Toxicologia

Orientado(a): Carla Brigagão Pacheco da Silva

Orientador: Prof. Dr. Carlos Renato Tirapelli

Versão corrigida da Tese de Doutorado Direto apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia no dia 15/05/2020. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2020

RESUMO

SILVA, C. B. P. **Mecanismos da toxicidade renal induzida pelo consumo crônico de etanol: papel da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS)**. 2020. 104 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

O consumo crônico de etanol está associado ao aumento de estresse oxidativo e inflamação, podendo induzir a progressão e desenvolvimento de doenças. Apesar de alguns estudos descreverem que o etanol acarreta alterações da função renal, os mecanismos envolvidos nessa resposta não foram totalmente elucidados. Sabe-se que a administração crônica de etanol pode induzir a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), produzindo concentrações elevadas de óxido nítrico (NO), e aumentar a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), principalmente o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$). A reação do NO com o $O_2^{\cdot-}$ leva à formação de peroxinitrito (ONOO $^-$), um poderoso agente oxidante que contribui para a fisiopatologia da disfunção renal. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a participação da iNOS na toxicidade renal induzida pelo consumo crônico de etanol. Para isso, camundongos C57BL/6J (WT) e nocautes para a iNOS (iNOS $^{-/-}$) foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos: controle WT e iNOS $^{-/-}$ com acesso à água filtrada; etanol WT e etanol iNOS $^{-/-}$ com acesso à solução de etanol 20% (vol./vol.) por 10 semanas. Nossos resultados demonstraram redução na ingestão de líquido e ração, menor ganho de peso e indução do aumento da pressão arterial sistólica (PAS) em animais WT e iNOS $^{-/-}$ tratados com etanol. Assim como o esperado, observamos que a exposição crônica ao etanol induziu aumento da expressão da enzima iNOS em córtex renal de camundongos. Além disso, aumento dos níveis séricos de creatinina e alterações morfológicas, como aumento do diâmetro dos glomérulos e edema intersticial foram encontrados em animais WT e iNOS $^{-/-}$ tratados com etanol, sugerindo disfunção renal induzida pelo etanol. No córtex renal, o tratamento crônico com etanol aumentou o estresse oxidativo, caracterizados pelo aumento dos níveis de $O_2^{\cdot-}$, intensidade de fluorescência da sonda de dihidroetídio (DHE), expressão proteica de Nox4, além da indução de aumento dos níveis de lipoperoxidação; sendo essas respostas atenuadas ou bloqueadas em animais iNOS $^{-/-}$. Em relação ao sistema antioxidante, a exposição ao etanol diminuiu a expressão de catalase em paralelo ao aumento dos níveis de glutathiona reduzida (GSH), sem alterar as atividades enzimáticas de catalase, superóxido dismutase (SOD) e glutathiona peroxidase (GPx) nem os níveis de glutathiona oxidada (GSSG) em animais WT e iNOS $^{-/-}$. Os níveis de nitrato/nitrito (NO $_x$) não foram afetados pelo etanol, porém o córtex renal de camundongos iNOS $^{-/-}$ apresentou concentrações menores em relação aos WT. O consumo crônico de etanol aumentou os níveis das citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral (TNF)- α e interleucina (IL)-1 β , além da migração de neutrófilos no córtex renal. Tanto o aumento de TNF- α quanto da atividade de mieloperoxidase (MPO) foram atenuados em animais iNOS $^{-/-}$, sugerindo que a resposta inflamatória no rim é mediada pela iNOS. Entretanto, não houve diferença da atividade de metaloproteinases de matriz (MMP) -2 e -9, da expressão proteica de Nox1, Nox2, MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2, eNOS, nNOS, NF- κ B, Nrf2 nem dos níveis de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), íons K^+ e Na^+ , ureia, IL-6 e IL-10 entre os grupos, após o consumo de etanol. Concluímos que nem todas as alterações renais induzidas pelo etanol foram mediadas pela iNOS, porém observamos o papel desta enzima na toxicidade renal, como importante mediadora da inflamação e estresse oxidativo induzidos pelo consumo crônico de etanol em córtex renal de camundongos.

Palavras-chave: Consumo crônico de etanol. Óxido nítrico sintase induzível (iNOS). Estresse oxidativo. Inflamação. Toxicidade renal.

ABSTRACT

SILVA, C. B. P. **Mechanisms underlying the renal toxicity induced by chronic ethanol consumption: the role of inducible nitric oxide synthase (iNOS)**. 2020. 104 f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Chronic ethanol consumption is related to enhancement of oxidative stress and inflammation that can induce progression and development of diseases. Despite some studies described that ethanol leads to renal function disorders, the mechanisms underlying this response have not been fully elucidated. Chronic ethanol intake can induce expression of the inducible nitric oxide synthase (iNOS) isoform, leading to an increase of nitric oxide (NO) levels, and improve reactive oxygen species (ROS) production, mainly superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$). The reaction between NO and $O_2^{\cdot-}$ results in peroxynitrite ($ONOO^-$) formation, a powerful oxidant molecule that contributes to the pathophysiology of renal dysfunction. Thus, the objective of the present study was to evaluate the role of iNOS in the renal toxicity induced by chronic ethanol consumption. To this purpose, C57BL/6 (WT) and iNOS knockout ($iNOS^{-/-}$) mice were randomly distributed into 4 groups: control WT and $iNOS^{-/-}$ with free access to filtered water; ethanol WT and ethanol $iNOS^{-/-}$ with access to ethanol 20% (vol./vol.) per 10 weeks. Our results showed that long-term ethanol consumption decreased liquid and solid intake, weight gain, and induced increased systolic blood pressure (SBP) in WT and $iNOS^{-/-}$ animals treated with ethanol. We observed increased iNOS expression in cortex renal from WT mice after chronic ethanol exposure. There was increase of creatinine serum levels and morphological alterations, as interstitial edema and increased glomerular diameter in renal cortex of both WT and $iNOS^{-/-}$ mice chronically treated with ethanol, implying renal dysfunction induced by ethanol. In the renal cortex, chronic ethanol treatment increased oxidative stress characterized by augmented of $O_2^{\cdot-}$ levels, as well as fluorescence intensity of dihydroethidium (DHE) probe, protein expression of Nox4, in addition to the increase of lipoperoxidation. These responses were attenuated or blocked in $iNOS^{-/-}$ animals. Regarding the antioxidant system, ethanol exposure decreased catalase expression in parallel with the increase of reduced glutathione (GSH) levels, without affect the enzymatic activity of catalase, superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) nor oxidized glutathione (GSSG) levels in WT and $iNOS^{-/-}$ animals. Ethanol did not alter nitrate/nitrite (NO_x) levels, but the renal cortex of $iNOS^{-/-}$ mice showed lower concentrations than WT. Chronic ethanol consumption increased the levels of proinflammatory cytokines tumor necrosis factor (TNF)- α and interleukins (IL)-1 β , besides the neutrophil recruitment into the renal cortex. Both the increased TNF- α levels and myeloperoxidase (MPO) activity observed in ethanol WT mice have been attenuated in knockout animals, suggesting that the inflammatory response in the kidney is mediated by iNOS. Matrix metalloproteinases (MMP)-2 and -9 activity, Nox1, Nox2, MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2, eNOS, nNOS, NF- κ B and Nrf2 protein expression nor hydrogen peroxide (H_2O_2), K^+ and Na^+ ions, urea, IL-6 and IL-10 levels did not differ among the groups after treatment with ethanol. We concluded that iNOS has not been involved in all effects induced by ethanol, however we verified the role of this enzyme in the renal toxicity, as an important mediator of inflammation and oxidative stress induced by chronic ethanol consumption in renal cortex from mice.

Keywords: Chronic ethanol consumption. Inducible nitric oxide synthase (iNOS). Oxidative stress. Inflammation. Renal toxicity.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Etanol

O termo alcoolismo crônico foi introduzido em 1849 pelo médico e pesquisador sueco Magnus Huss, que o definiu como “um conjunto de manifestações patológicas do sistema nervoso, nas esferas psíquica, sensitiva e motora” (GIGLIOTTI; BESSA, 2004; HECKMANN; SILVEIRA, 2009). O alcoolismo é atualmente considerado uma doença crônica, e o etilista crônico é definido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como “um bebedor excessivo, cuja dependência em relação ao álcool é acompanhada de perturbações mentais, da saúde física, da relação com os outros e do comportamento social e econômico” (OMS, 2004).

O consumo de álcool é medido por doses¹, sendo os principais padrões de consumo de bebidas alcoólicas identificados como uso moderado (7-10 doses/semana para mulheres e 14-15 doses/semana para homens), uso excessivo (8 ou mais doses/semana para mulheres e 15 ou mais doses/semana para homens) e uso pesado episódico – conhecido como *binge drinking* – (4 ou mais doses para mulheres e 5 ou mais doses para homens, em uma única ocasião) (SENAD, 2011; OMS, 2014; US DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES; US DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 2015).

Segundo a OMS (2014), indivíduos adultos (15 anos ou mais de idade) bebem em média 6,2 litros de álcool puro anualmente, o que corresponde a 13,5 gramas de álcool puro por dia. No Brasil, a Secretaria Nacional de Políticas sobre Drogas (SENAD) realizou um levantamento para caracterizar o padrão nacional de consumo de etanol e os dados de frequência demonstraram que 52% dos brasileiros (18 anos ou mais de idade) fazem uso de bebidas alcoólicas, sendo que 11% dos homens adultos bebem todos os dias e 28% consomem bebida alcoólica de 1-4 vezes por semana. Vale ressaltar que 9% da população brasileira apresenta a síndrome de dependência do álcool (SENAD, 2007). Em 2017, o monitoramento realizado pela Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (Vigitel) mostrou uma prevalência do consumo excessivo de álcool de 19,1% – 2,2 vezes superior entre homens (27,1%) em relação às mulheres (12,2%) (BRASIL, 2018).

O consumo de etanol gera cerca de 3,3 milhões de mortes no mundo a cada ano, o que representa 5,9% do total de mortes (OMS, 2014). Além disso, o uso excessivo de bebidas alcoólicas é fator responsável, direta ou indiretamente, por mais de 200 tipos de doenças, ¹uma dose equivale a cerca de 10 a 12g de álcool etílico, o que corresponde a 350 ml de cerveja, 90 ml de vinho ou 30 ml de bebida destilada (SENAD, 2007, 2011).

incluindo desordens neuropsiquiátricas (epilepsia, depressão, ansiedade), doenças gastrointestinais (cirrose hepática, pancreatite, gastrite), câncer (de boca, esôfago, fígado, cólon, mama), doenças cardiovasculares (hipertensão, cardiomiopatia alcoólica), síndrome alcoólica fetal, doenças infecciosas (pneumonia, tuberculose e doenças sexualmente transmissíveis) (OMS, 2004, 2014), desordens neuromusculares (cãibras, formigamentos e perda da força muscular), sexuais (impotência e infertilidade), ósseas, pulmonares e renais (necrose tubular, disfunção tubular renal e albuminúria) (HECKMANN; SILVEIRA, 2009; TIRAPELLI et al., 2012). Porém, apesar de estabelecida a relação entre o consumo de etanol e o desenvolvimento de disfunções renais, os mecanismos envolvidos nessa resposta não são totalmente entendidos (CIGREMIS et al., 2006; TIRAPELLI et al., 2012).

De acordo com os pesquisadores Chung et al. (2005), o consumo de etanol altera a taxa de filtração glomerular e a de depuração de creatinina, além de alterar indiretamente a função renal por elevar a pressão sanguínea, induzir desequilíbrio eletrolítico e hiperuricemia, além dos efeitos sobre o perfil lipídico e a regulação de peptídeos vasoativos.

Estudos conduzidos por Latchoumycandane, Nagy e McIntyre (2014) mostraram que o consumo crônico de etanol aumenta a expressão da citocromo P450-2E1 (CYP2E1) em rim de ratos Wistar. A atividade catalítica dessa enzima requer a ativação de oxigênio, resultando na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) (KAWARATANI et al., 2013), o que pode induzir o estresse oxidativo renal.

Estudos demonstraram que o consumo de etanol está associado ao estresse oxidativo em diferentes órgãos e tecidos, causando lesões nas células afetadas, como, por exemplo, em neurônios, nos quais há ação direta por alteração da fluidez da membrana de bicamada lipídica e da permeabilidade que afeta a condução de canais de íons (canal de potássio, por exemplo) (HAORAH et al., 2008); em hepatócitos, cujos danos estão associados ao aumento da lipoperoxidação, formação de proteínas carboniladas, de radical 1-hidroxietil e de radicais lipídicos e diminuição das defesas antioxidantes hepáticas, especialmente a glutatona reduzida (GSH) (LU; CEDERBAUM, 2008); e em células renais, devido à alteração do estado de oxidação e do sistema antioxidante de defesa, que está relacionada ao aumento de ERO, ao metabolismo do etanol, o que leva à formação de compostos tóxicos, como o acetaldeído, e aos efeitos na membrana celular renal, levando a lipoperoxidação, diminuição da biossíntese de ácidos graxos poli-insaturados e alteração de fosfolipídeos e colesterol da membrana (DAS et al., 2008; ADEWALE; IFUDU, 2014; MCCARTHY et al., 2015).

O aumento da formação de ERO participa do processo de nefropatia por mudar estrutural e funcionalmente o glomérulo e estar associado a múltiplas anomalias do túbulo renal, levando à disfunção generalizada tubular. Além de gerar distúrbios renais por afetar a regulação do conteúdo de eletrólitos, do volume extracelular e o equilíbrio ácido-base (FUNAKOSHI et al., 2012; ADEWALE; IFUDU, 2014).

A ingestão aguda de etanol pode induzir diurese por agir na hipófise, inibindo a liberação do hormônio antidiurético com concomitante redução na excreção de eletrólitos na urina. Porém, durante um estado de equilíbrio ou consumo crônico, pequenas quantidades de urina são produzidas, pois o etanol passa a atuar como um estímulo antidiurético, havendo retenção de água e maior excreção de eletrólitos oriundos de fluido extracelular (ADEWALE; IFUDU, 2014). Deste modo induz o desenvolvimento de hipomagnesemia, devido à diminuição da reabsorção de magnésio na alça de Henle, e disfunção mitocondrial, fator este que intensifica a lesão renal. Além disso, o etanol pode interferir na função de transportadores da membrana, diminuindo a atividade da Na^+/K^+ ATPase, enquanto o acetaldeído inibe a atividade de diversas enzimas levando a uma menor eficiência das células (CIGREMIS et al., 2006; ADEWALE; IFUDU, 2014).

Por conseguinte, o consumo de quantidades excessivas de etanol está associado ao aumento do risco de insuficiência renal, disfunção tubular renal, necrose tubular aguda, glomerulonefrite, albuminúria bem como nefropatia (TIRAPELLI et al., 2012; MCCARTHY et al., 2015).

Como mencionado anteriormente, o consumo de etanol aumenta a produção de ERO, decorrente da indução de enzimas, principalmente a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH) oxidase, além de levar à peroxidação lipídica e/ou depleção de componentes do sistema antioxidante (JORDÃO JÚNIOR et al., 1998; BARBOSA et al., 2010), o que podem resultar em estresse oxidativo, inflamação e doenças renais.

1.2 NAD(P)H oxidase

A NAD(P)H oxidase é um complexo enzimático que tem como principal função a produção de ERO. A enzima é formada por diferentes subunidades e catalisa a produção de ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) pela redução de oxigênio molecular (O_2), usando NADPH ou nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido (NADH) como substrato (Equação 1) (PARAVICINI; TOUYZ, 2008; SEDEEK et al., 2013). O protótipo de NAD(P)H oxidase,

encontrada em neutrófilos, é formada por 5 subunidades: p47phox (“*phox*” ou “*phagocyte oxidase*” – oxidase fagocítica), p67phox, p40phox, p22phox e a subunidade catalítica gp91phox (também chamada de Nox2). As subunidades p47phox, p67phox e p40phox estão localizadas no citoplasma enquanto as subunidades gp91phox e p22phox estão localizadas na membrana, onde são encontradas na forma de uma flavoproteína heterodimérica, o citocromo *b558*. Em situações de estimulação celular, ocorre a fosforilação do aminoácido serina da subunidade p47phox e as unidades citoplasmáticas formam um complexo, que se transloca até a membrana, onde se associa ao citocromo *b558* para formar a enzima ativa, que tem por função transferir elétrons do substrato (NADPH ou NADH) para o O₂, formando assim o O₂^{•-} (HAORAH et al., 2008; PARAVICINI; TOUYZ, 2008; SEDEEK et al., 2013).

A descoberta de homólogos da gp91phox indicou a existência de uma família de NAD(P)H oxidases. Os novos homólogos, juntamente com a gp91phox, são designados como a família Nox das NAD(P)H oxidases e compreendem sete membros, caracterizados pela subunidade catalítica que utilizam: Nox1, Nox2 (gp91phox), Nox3, Nox4 (originalmente chamada *Renox* – *renal oxidase* – oxidase renal), Nox5, Duox1 e Duox2 (TOUYZ; BRIONES, 2011). Essas enzimas são expressas em diferentes tecidos onde desempenham ações biológicas diversificadas.

No rim, o principal homólogo é a Nox4 que não participa apenas das funções renais normais, mas também contribui para o desenvolvimento de doenças, como hiperglicemia, nefropatia diabética, disfunção glomerular associada à diabetes, fibrose e outras doenças renais crônicas (JHA et al., 2014; OKAMURA; PENNATHUR, 2015). A Nox4 é a principal fonte de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) entre as subunidades pertencentes à família Nox das NAD(P)H oxidases, principalmente quando comparada aos homólogos Nox1 e Nox2, uma vez que possui uma alça extracitosólica (*E-loop*) que obstrui a liberação do O₂^{•-} formado e fornece uma fonte de prótons, permitindo uma rápida dismutação de O₂^{•-} a H₂O₂ (TAKAC et al., 2011; GORIN, 2013; OKAMURA; PENNATHUR, 2015).

1.3 Biomarcadores de danos oxidativos

O aumento da produção de óxido nítrico (NO) é um dos efeitos renais desencadeados pela ingestão de etanol (CIGREMIS et al., 2006; TIRAPELLI et al., 2012). Este radical livre é uma molécula inorgânica, hidrofóbica, apresenta um elétron desemparelhado e meia-vida curta.

Possui várias funções fisiológicas, dentre elas pode-se citar o relaxamento do músculo liso vascular, inibição da ativação de plaquetas, regulação da pressão sanguínea, mediação citotóxica de células imunológicas, regulação da resposta imune, bem como a participação em processos de neurotransmissão, envolvimento na regulação endócrina e regulação de caspases (FLORA FILHO; ZILBERSTEIN, 2000; DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003; LINARES, 2003; SHARMA, 2004; CHIRINO; OROZCO-IBARRA; PREDAZA-CHAVERRÍ, 2006; VOISIN et al., 2014).

O NO é sintetizado a partir da oxidação enzimática do aminoácido L-arginina, cujos produtos finais são a L-citrulina e o NO, e requer O₂, NADPH, tetrahidrobiopterina (BH₄), flavina adenina dinucleótido (FAD), flavina mononucleótido (FMN) e calmodulina como co-fatores. A reação é catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) que possui três isoformas principais: a neuronal (nNOS ou NOS1), a endotelial (eNOS ou NOS3) e a induzível (iNOS ou NOS2) (FLORA FILHO; ZILBERSTEIN, 2000; DAVIS et al., 2001; DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003; SHARMA, 2004; VOISIN et al., 2014).

A nNOS advém do cromossomo 7 e atua como neurotransmissor em células neuronais e não neuronais. O cromossomo 17 é responsável pela expressão da eNOS, que no endotélio vascular leva à produção do NO que irá induzir relaxamento vascular. Estas isoformas são enzimas constitutivas, cujas atividades são dependentes da concentração de cálcio intracelular e de calmodulina, e as concentrações sintetizadas de NO são da ordem de nanomolar (DAVIS et al., 2001; DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003; LINARES, 2003; VOISIN et al., 2014). Enquanto que a iNOS, derivada do cromossomo 12 e presente em células musculares lisas vasculares e macrófagos ativados, pode ser induzida de 2 a 4 h após exposição a endotoxinas ou por estimulação via citocinas pró-inflamatórias como interleucina (IL)-1 β , interferon- γ (IFN- γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). É cálcio independente, produzida em níveis mais elevados quando comparado às isoformas constitutivas, principalmente em relação a isoforma eNOS e, uma vez expressa, produz maiores concentrações de NO, cujos níveis podem alcançar a ordem de micromolar, e sua produção continua até que ocorra a depleção do seu precursor, a L-arginina, dos co-fatores necessários para sua síntese e/ou ocorra a apoptose da célula (FLORA FILHO; ZILBERSTEIN, 2000; DAVIS et al., 2001; CERQUEIRA; YOSHIDA, 2002; DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003; LINARES, 2003; VOISIN et al., 2014).

As isoformas constitutivas da NOS são expressas no rim, onde participam do controle da função renal. A enzima eNOS é abundantemente expressa no endotélio vascular renal, na

porção espessa ascendente da alça de Henle, no endotélio glomerular, no túbulo proximal e nos ductos coletores e auxilia na regulação do volume de líquido extracelular. O NO produzido participa da regulação da secreção de renina, regula a microcirculação na medula renal e protege contra o estresse oxidativo. No ramo ascendente grosso, o NO diminui a reabsorção de cloreto de sódio (NaCl) e bicarbonato de sódio (NaHCO₃) (GOLIGORSKY; BRODSKY; NOIRI, 2002; ORTIZ; GARVIN, 2003; SHARMA, 2004). A enzima nNOS é expressa nos ductos coletores, na mácula densa e em nervos renais pélvicos, e tem por função a modulação do mecanismo de retroalimentação túbulo-glomerular (SHARMA, 2004).

A iNOS, diferente das isoformas constitutivas eNOS e nNOS, está associada à disfunção renal, uma vez que produz grande quantidade de NO (SHARMA, 2004). Esta isoforma é regulada, parcialmente, pela ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF-κB) por via de citocinas pró-inflamatórias – TNF-α, IL-1 e IFN-γ (GOCHMAN et al., 2012) –, levando a um aumento da sua expressão renal. O NO, mediado pela iNOS, acredita-se estar envolvido no desenvolvimento de hipertensão arterial; lipoperoxidação de membranas; oxidação, nitração e nitrosilação de proteínas; danos ao DNA; efeitos pró-apoptóticos e lesão renal (DAVIS et al., 2001; NOIRI et al., 2001; ORTIZ; GARVIN, 2003; CHIRINO; OROZCO-IBARRA; PREDAZA-CHAVERRÍ, 2006). Além disso, a inibição, depleção ou deleção da iNOS está associada a efeitos renoprotetores (NOIRI et al., 2001; TIRAPELLI et al., 2012).

Como mencionado anteriormente, o NO, em concentrações fisiológicas nos rins, é responsável pela manutenção da hemodinâmica renal por meio da regulação da liberação de renina e função glomerular adequada, reabsorção de fluidos e pelo *feedback* no sistema túbulo-glomerular. Porém, alterações na expressão das NOS, com consequente aumento da produção de NO, contribui para a fisiopatologia de doenças renais como, por exemplo, insuficiência renal aguda, glomerulonefrite e nefropatia diabética (DAVIS et al., 2001; DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003; SHARMA et al., 2004). É importante ressaltar que o etanol leva ao aumento da produção de NO por aumentar a expressão da eNOS mas, principalmente da iNOS em diferentes tecidos, dentre eles as células endoteliais vasculares, miocárdio, aorta, fígado, ovário, músculo cavernoso e rins (SRIVASTAVA et al., 1999; VENKOV et al., 1999; YUAN et al., 2006; TIRAPELLI et al., 2008; TIRAPELLI et al., 2011, 2012; ADEWALE; IFUDU, 2014). Estudo realizado por nosso grupo de pesquisa mostrou que o consumo crônico de etanol induz necrose tubular e aumento da expressão renal de iNOS (TIRAPELLI et al., 2012). Embora

o etanol tenha sido descrito como indutor da iNOS, a relação entre essa enzima e o desenvolvimento da disfunção renal induzida pelo consumo de etanol continua elusiva.

A reação do $O_2^{\cdot -}$ com NO leva à formação do radical peroxinitrito ($ONOO^{\cdot -}$) (Equação 2), um poderoso agente oxidante que é o principal mecanismo de ação da citotoxicidade do NO. O $ONOO^{\cdot -}$ é capaz de interagir com uma variedade de moléculas, como aminoácidos, íons metálicos, proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos; realizar nitração e oxidação de proteínas; lipoperoxidação lipídica; oxidação de moléculas que atuam como cofatores, tal como a BH_4 ; ativação de metaloproteinases de matriz (MMPs); causar danos ao DNA; disfunção renal; além de inativar enzimas, como a superóxido dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase (GPx) e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (BECKMAN; KOPPENOL, 1996; GOLIGORSKY; BRODSKY; NOIRI, 2002; RODRIGO; RIVERA, 2002; DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003; CHIRINO; OROZCO-IBARRA; PREDAZA-CHAVERRÍ, 2006; MUKHOPADHYAY et al., 2009). Além disso, na presença de íons H^+ , o $ONOO^{\cdot -}$ pode protonar-se a ácido peroxinitroso ($ONOOH$) que se decompõe prontamente em radical dióxido de nitrogênio ($NO_2^{\cdot -}$), um poderoso agente nitrante e promotor de lipoperoxidação, e em radical hidroxila ($OH^{\cdot -}$), que é extremamente tóxico, induz apoptose e reage com qualquer componente celular, sendo esta reação considerada a etapa final na via de sinalização NO/ $ONOO^{\cdot -}$ (DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003; CHIRINO; OROZCO-IBARRA; PREDAZA-CHAVERRÍ, 2006; BAUER, 2015; OKAMURA; PENNATHUR, 2015).

Chirino, Orozco-Ibarra e Predaza-Chaverrí (2006) sugerem a participação do $ONOO^{\cdot -}$ na patogênese de diversas enfermidades, tais como Alzheimer, diabetes, isquemia focal cerebral, hipertensão, disfunção cardíaca, artrite, colite e em enfermidades pulmonares e renais (insuficiência renal aguda).

A exposição excessiva ao álcool etílico está relacionada não só ao aumento dos níveis de ERO, mas também a uma diminuição dos mecanismos de defesa antioxidantes (RODRIGO; RIVERA, 2002; OYENIHI et al., 2016) como, por exemplo, diminuição nos níveis de GSH e vitamina E, e inibição das atividades das enzimas SOD, catalase e GPx (WU; CEDERBAUM, 2003; JORDÃO JÚNIOR et al., 2009). Portanto, muitos modelos experimentais utilizam a avaliação desses sistemas de defesa para confirmar os efeitos tóxicos relacionados ao consumo de etanol.

Em experimentos realizados por Shanmugam et al. (2010), o grupo de animais tratados com etanol, apresentou redução significativa de SOD e GSH, além de alterações morfológicas

nos rins, tais como alterações degenerativas graves nos túbulos, infiltração celular difusa e congestão grave de vasos sanguíneos. Enquanto os pesquisadores Ineu et al. (2013) observaram aumento significativo da produção de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e de ERO no estômago e intestino de animais tratados; diminuição da atividade de SOD no estômago; e inibição da atividade de catalase no estômago, intestino e rim.

1.4 Processo inflamatório

Diversos fatores, tais como estresse oxidativo, inflamação e alteração da resposta imune podem mediar o desenvolvimento e progressão de doenças induzidas pela exposição ao etanol (KAWARATANI et al., 2013). Sabe-se que o consumo de etanol está associado a alterações na resposta de células inflamatórias, como monócitos, macrófagos e células dendríticas (SZABO et al., 2007; MANDREKAR et al., 2009). Os macrófagos podem produzir citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- α e IL-1, além de ERO. A produção dessas citocinas é regulada por receptores do tipo Toll (TLR – *toll-like receptors*), fatores de transcrição, principalmente o NF- κ B, e citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10 (MANDREKAR et al., 1996; LIANG; ZHOU; SHEN, 2004; SZABO et al., 2007; PASCUAL; FERNÁNDEZ-LIZARBE, GUERRI, 2011; KAWARATANI et al., 2013; KIZILTAS, 2016).

O processo inflamatório é modulado diferentemente pelo consumo agudo e crônico de etanol. Szabo et al. (2007) mostraram que monócitos de sangue periférico estimulados com lipopolissacarídeo (LPS), quando expostos agudamente ao álcool (25 mM por 40 h), apresentaram menor expressão gênica de proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1), TNF- α e membros reguladores da via de sinalização do NF- κ B, incluindo a quinase indutora de NF- κ B (NIK) e inibidor de proteína NF- κ B alfa (I κ B α), além do aumento de IL-10. Essa relação entre o consumo agudo de etanol e efeitos anti-inflamatórios corrobora estudos de Mandrekar et al. (2006), os quais também observaram níveis reduzidos de citocinas pró-inflamatórias, TNF- α e IL-1 β , consequentes da inibição de NF- κ B.

Entretanto, um aumento na indução de mediadores da inflamação, como TNF- α , IL-6 e NF- κ B, foi observado após exposição crônica ao etanol tanto em modelos *in vitro* (SZABO et al., 2007) quanto *in vivo* (LEITE et al., 2017; SIMPLICIO et al., 2017; CERON et al., 2018). Além disso, estudos no nosso grupo de pesquisa mostraram aumento da infiltração de células inflamatórias em diferentes tecidos, incluindo aorta torácica (SIMPLICIO et al., 2017), músculo liso cavernoso (LEITE et al., 2017) e coração (NAKASHIMA et al., 2019).

Nesse sentido, o consumo crônico de etanol está associado ao aumento da inflamação, uma vez que regula vias de transcrição gênica, induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, citocinas quimiotáticas ou atenuação na formação de citocinas anti-inflamatórias, bem como a indução do recrutamento de leucócitos. Portanto, a determinação da infiltração de células inflamatórias e os níveis dessas citocinas no tecido renal são importantes, pois uma resposta inflamatória exacerbada pode levar ao desenvolvimento e progressão de doenças em órgãos afetados.

1.5 Metaloproteinases de matriz

As metaloproteinases são endopeptidases dependentes de zinco (Zn^{2+}) e sintetizadas como zimogênios (pro-MMP) (BENYON; ARTHUR, 2001; CENA; CHOW; SCHULZ, 2007). Essas enzimas estão envolvidas na degradação de componentes da matriz extracelular e no remodelamento tecidual, incluindo processos fisiológicos (embriogênese e angiogênese) bem como condições patológicas (invasão de células tumorais) (CENA; CHOW; SCHULZ, 2007; SUNG et al., 2007).

A ativação de pro-MMPs pode ocorrer por mecanismos proteolíticos – remoção proteolítica de um domínio amino-terminal autoinibitório e, subsequente, exposição do sítio catalítico – e não proteolíticos – mudanças conformacionais do resíduo de cisteína no domínio amino-terminal autoinibitório induzidas por agentes desnaturantes ou oxidantes, como o ONOO^- (OKAMOTO et al., 1997; CENA; CHOW; SCHULZ, 2007; DONNINI et al., 2008; VIAPPIANI et al., 2009) (Figura 1).

Figura 1. Ativação de metaloproteinases de matriz (MMPs). As MMPs são sintetizadas na sua forma inativa (pro-MMP), podendo ser ativadas por proteólise – remoção de um própeptídeo por proteases – ou ONOO^- – sob condições de estresse oxidativo, o ONOO^- oxida a porção sulfidrílica (SX) do grupo cisteinil coordenado com íon Zn^{2+} no sítio catalítico.

Fonte: Adaptado de CENA; CHOW; SCHULZ (2007)

As MMPs são divididas de acordo com seus substratos em cinco subclasses funcionais: collagenases (MMP-1, -8 e -13); gelatinases (MMP-2 e -9); estromelinas (MMP-3, -7, -10 e -11); matrilisinas (MMP-7 e -26) e tipo-membrana MMPs (MT-MMPs) (MMP-14, -15, -16, -17, -24 e -25) (BENYON; ARTHUR, 2001; CENA; CHOW; SCHULZ, 2007).

Existem inibidores teciduais de MMPs (TIMPs), incluindo os TIMP-1, -2, -3 e -4, que são proteínas endógenas produzidas por uma variedade de células, envolvidos na regulação e inibição destas e secretados frequentemente junto com as MMPs (BENYON; ARTHUR, 2001; CENA; CHOW; SCHULZ, 2007). O balanço entre a atividade de TIMPs e MMPs ativas é um fator crítico no controle do remodelamento do tecido conectivo, sendo que uma mudança a favor de metaloproteinases está envolvida em processos de doenças (FREARS et al., 1996), tais como sepse, artrite inflamatória, doenças cardiovasculares, pulmonares (CENA; CHOW; SCHULZ, 2007; SUNG et al., 2007) e neurodegenerativas (YONG et al., 1998).

Os TIMPs apresentam outros papéis além da atividade sobre as MMPs como, por exemplo, regulação da proliferação celular, invasão de células, apoptose e angiogênese (JIANG; GOLDBERG; SHI, 2002). TIMP-1 e TIMP-2 estimulam a proliferação de células e protegem contra a apoptose. O TIMP-3 induz apoptose em células tumorais e células do músculo liso vascular (BENYON; ARTHUR, 2001). Já o TIMP-4 participa do processo de carcinogênese, podendo apresentar uma expressão aumentada em determinadas neoplasias, tais como: carcinoma endometrial (TUNUGUNTLA et al., 2003), câncer cervical (LIZARRAGA et al., 2005), carcinoma mamário (JIANG et al., 2001) e câncer gástrico (KOYAMA, 2004).

Durante o processo de fibrogênese, algumas dessas MMPs, tais como MMP-1, -2 e -13, são expressas nas células hepáticas estreladas ativas (BENYON; ARTHUR, 2001). De acordo com Migita et al. (2005), sinais de estresse oxidativo e peroxidação lipídica são concomitantes ou precedem a ativação dessas células e deposição de colágeno. Além disso, sabe-se que essas células expressam NAD(P)H oxidase e iNOS, com produção de $O_2^{\bullet-}$ e NO, podendo levar a geração de $ONOO^-$ (MIGITA et al., 2005).

Tem sido relatada a relação do $ONOO^-$ com a destruição tecidual *in vivo*, a qual pode ser explicada pela inibição de TIMPs, como TIMP-1 (FREARS et al., 1996) e TIMP-4 (DONNINI et al., 2008), ou pelo aumento da atividade e/ou expressão de MMPs (RORK et al., 2006; CENA; CHOW; SCHULZ, 2007). A inativação dos inibidores pelo $ONOO^-$ pode ser bloqueada pela adição de tirosina, triptofano, tioureia, desferrioxamina e metionina, uma vez que estes compostos podem reagir rapidamente com esse agente (FREARS et al., 1996).

Segundo Donnini et al. (2008), TIMP-4 inibe a atividade de MMP-2 e reduz a invasão induzida por fator de crescimento de células tumorais e endoteliais; porém quando tratado com ONOO^- , este promove sua nitração em resíduos de tirosina e sua oligomerização, perdendo, assim, sua capacidade de inibição e, conseqüentemente, ocorre um aumento da invasão de células. Esses efeitos contribuem para a progressão de tumores e doenças cardiovasculares.

Estudos conduzidos por Rork et al. (2006) mostraram que a MMP-2 é responsável, em partes, pelos danos observados no coração, devido a ativação pelo ONOO^- . Essa ativação também foi relatada por Sung et al. (2007), os quais demonstraram que após infusão de ONOO^- em coração de ratos isolados, houve degradação de α -actina citoesquelética pela MMP-2. Okamoto et al. (2001) demonstraram ainda a ativação das formas zimogênicas de MMP-1, -8 e -9 pelo ONOO^- .

Na progressão e reparo de doenças renais, o remodelamento de matriz extracelular é uma etapa crítica, sendo as metaloproteinases tipo gelatinases (MMP-2 e -9) as mais importantes nesse evento, uma vez que clivam componentes da membrana basal, como colágeno tipo IV, gelatinas e fibronectinas (RONCO; CHATZIANTONIOU, 2008). Além disso, já foi relatada a indução de alterações no epitélio tubular renal por MMP-2, o que está associado ao desenvolvimento de fibrose intersticial em doenças renais (CHENG; LOVETT, 2003).

De acordo com Tirapelli et al. (2012), o consumo de etanol aumenta a atividade de MMP-2, corroborando os estudos de Lois et al. (1999), nos quais o tratamento com etanol aumentou a atividade, mas não a produção, de MMP-2 e -9, via depleção do antioxidante glutatona. Esse aumento da atividade também foi relatado por Sillanaukee et al. (2002), sendo que etilistas crônicos apresentaram elevados níveis séricos de MMP-9, os quais podem representar um marcador de inflamação frente ao consumo crônico de etanol. Porém como essas enzimas são secretadas por diferentes células (macrófagos, monócitos, células polimorfonucleares, células mesenquimais e tumorais, por exemplo), o órgão responsável por esse aumento permanece elusivo (LOIS et al., 1999; SILLANAUKKEE et al., 2002).

A relação entre o consumo de etanol e a ativação de MMPs e/ou inativação de TIMPs pode ser relevante em condições fisiopatológicas associadas com um aumento no estresse oxidativo na toxicidade renal. Portanto, torna-se pertinente a avaliação dessas MMPs.

Em suma, o conjunto de dados apresentados demonstra que a ingestão crônica de etanol acarreta alterações significativas da função renal, figurando como um importante fator de risco no desenvolvimento e progressão da disfunção renal. Porém, os mecanismos envolvidos na

toxicidade renal induzida pela ingestão de etanol e a participação da iNOS nessa toxicidade não são inteiramente compreendidos. Portanto, a hipótese do presente estudo é a de que o consumo crônico de etanol induza a expressão de iNOS e aumente a produção de ERO no rim via NAD(P)H oxidase. Esse processo levaria à formação de ONOO^- e, por conseguinte, alteração da função e estrutura renal.

2 CONCLUSÕES

A partir dos resultados experimentais obtidos, podemos concluir que o consumo crônico de etanol induz redução no ganho de massa corporal, aumento da PAS, prejuízo da filtração glomerular, aumento do diâmetro de glomérulos renais, edema intersticial, alteração do sistema antioxidante renal e aumento de IL-1 β , sendo alterações não mediadas pela enzima iNOS. Além disso, é capaz de induzir aumento da produção de ERO e infiltração de neutrófilos em córtex renal, sendo essas respostas parcialmente mediadas pela iNOS, uma vez que essas alterações foram atenuadas em animais iNOS^{-/-}. No entanto, a iNOS está diretamente envolvida no aumento da expressão da subunidade catalítica Nox4, indução de lipoperoxidação e produção de TNF- α , sugerindo sua participação na toxicidade renal induzida pelo consumo de etanol.

REFERÊNCIAS²

ADEWALE, A.; IFUDU, O. Kidney injury, fluid, electrolyte and acid-base abnormalities in alcoholics. **Nigerian Medical Journal**, v. 55, p. 93-98, 2014.

AGUIAR, A. S.; DA-SILVA, V. A.; BOAVENTURA, G. T. Can calories from ethanol contribute to body weight preservation by malnourished rats? **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, p. 841-846, 2004.

AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, v. 124, p. 783–801, 2006.

AL-HARBI, N. F. et al. Psoriasis-like inflammation leads to renal dysfunction via upregulation of NADPH oxidases and inducible nitric oxide synthase. **International Immunopharmacology**, v. 46, p. 1-8, 2017.

AMORIM, R. G. et al. Kidney disease in diabetes mellitus: cross-linking between hyperglycemia, redox imbalance and inflammation. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 112, p. 577-687, 2019.

ARTEEL, G. E. Oxidants and antioxidants in alcohol-induced liver disease. **Gastroenterology**, v. 124, p. 778-790, 2003.

BALARINI, C. M. **Análise temporal da função renal em camundongos hipercolesterolêmicos**. 2009. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2009.

BARBOSA, K. B. F. et al. Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. **Revista de Nutrição**, v. 23, p. 629-643, 2010.

BAUER, G. Increasing the endogenous NO level causes catalase inactivation and reaction of intercellular apoptosis signaling specifically in tumor cells. **Redox Biology**, v. 6, p. 353-371, 2015.

BECKMAN, J. S.; KOPPENOL, W. H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. **American Journal of Physiology**, v. 271, p. C1424-C1437, 1996.

² De acordo com as Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP (2016).

BENYON, R. C.; ARTHUR, M. J. P. Extracellular matrix degradation and the role of hepatic stellate cells. **Seminars in liver disease**, v. 21, p. 373-384, 2001.

BLOCK, K.; GORIN, Y.; ABOUD, H. E. Subcellular localization of Nox4 and regulation in diabetes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, p. 14385-14390, 2009.

BORTOLOTTI, L. A. Arterial hypertension and chronic renal failure. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 15, p. 152-155, 2008.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos não Transmissíveis e Promoção da Saúde. **Vigitel Brasil 2017: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico: estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal em 2017**. Brasília: Ministério da Saúde, 2018.

BRIONES, A. M.; TOUYZ, R. M. Oxidative stress and hypertension: current concepts. **Current Hypertension Reports**, v. 12, p. 135-142, 2010.

CAREY, R. M. Newly discovered components and actions of the renin-angiotensin system. **Hypertension**, v. 62, p. 818-822, 2013.

CENA, J.; CHOW, A. K.; SCHULZ, R. Nitric oxide, peroxynitrite and matrix metalloproteinases: insight into the pathogenesis of sepsis. **Advances in Experimental Biology**, v. 01, p. 367-396, 2007.

CERON, C. S. et al. Vascular oxidative stress: a key factor in the development of hypertension associated with ethanol consumption. **Current Hypertension Reviews**, v. 10, p. 213-222, 2014.

CERON, C. S. et al. Chronic ethanol consumption increases vascular oxidative stress and the mortality induced by sub-lethal sepsis: potential role of iNOS. **European Journal of Pharmacology**, v. 825, p. 39-47, 2018.

CERQUEIRA, N. F.; YOSHIDA, W. B. Óxido nítrico: revisão. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 17, p. 417-423, 2002.

CHANG, K. et al. Nitric oxide suppresses inducible nitric oxide synthase expression by inhibiting post-translational modification of I κ B. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 36, p. 311-324, 2004.

CHATTERJEE, P. K. et al. GW274150, a potent and highly selective inhibitor of iNOS, reduces experimental renal ischemia/reperfusion injury. **Kidney International**, v. 63, p. 853-865, 2003.

CHENG, S.; LOVETT, D. H. Gelatinase A (MMP-2) is necessary and sufficient for renal tubular cell epithelial-mesenchymal transformation. **American Journal of Pathology**, v. 162, p. 1937-1949, 2003.

CHIRINO, Y. I.; OROZCO-IBARRA, M.; PREDAZA-CHAVERRÍ, J. Evidencias de la participación del peroxinitrito em diversas enfermedades. **Revista de Investigación Clínica**, v. 58, p. 350-358, 2006.

CHUNG, F. M. et al. Effect of alcohol consumption on estimated glomerular filtration rate and creatinine clearance rate. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 20, p. 1610-1616, 2005.

CIGREMIS, Y. et al. The effects of chronic exposure to ethanol and cigarette smoke on the formation of peroxynitrite level of nitric oxide, xanthine oxidase and myeloperoxidase activities in rat kidney. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 291, p. 127-138, 2006.

DAS, S. K. et al. Effects of chronic ethanol exposure on renal function tests and oxidative stress in kidney. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 23, p. 341-344, 2008.

DAS, S. K.; VASUDEVAN, D. M. Alcohol induced effects on kidney. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 23, p. 4-9, 2008.

DAVIS, K. L. et al. Novel effects of nitric oxide. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 41, p. 203-236, 2001

DIGNAM, J. D.; LEOVITZ, R. M.; ROEDER, R. G. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. **Nucleic Acids Research**, v. 11, p. 1475-1489, 1983.

DI MEO, S. et al. Role of ROS and RNS sources in physiological and pathological conditions. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 1-44, 2016.

DINIZ, M. C. et al. Mechanisms underlying sodium nitroprusside-induced tolerance in the mouse aorta: role of ROS and cyclooxygenase-derived prostanoids. **Life Sciences**, v. 176, p. 26-34, 2017.

DONNELLY, R.; COLLINSON, D. J.; MANNING, G. Hypertension, matrix metalloproteinases and target organ damage. **Journal of Hypertension**, v. 21, p. 1627-1630, 2003.

DONNINI, S. et al. Peroxynitrite inactivates human-tissue inhibitor of metalloproteinase-4. **FEBS Letters**, v. 582, p. 1135-1140, 2008.

DUSSE, L. M. S. A.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. D. G. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, p. 343-350, 2003.

FERNANDES, D. C. et al. Analysis of DHE-derived oxidation products by HPLC in the assessment of superoxide production and NADPH oxidase activity in vascular systems. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 292, p. C413-C422, 2007.

FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 46, p. 265-271, 2000.

FRANCESCATO, H. D. C. et al. Previous exercise effects in cisplatin-induced renal lesions in rats. **Kidney and Blood Pressure Research**, v. 43, p. 582-593, 2018.

FREARS, E. R. et al. Inactivation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by peroxynitrite. **FEBS Letters**, v. 381, p. 21-24, 1996.

FUJII, T. et al. Redox capacity of cells affects inactivation of glutathione reductase by nitrosative stress. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 378, p. 123-130, 2000.

FUKAI, T.; USHIO-FUKAI, M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 15, p. 1583-1606, 2011.

FUNAKOSHI, Y. et al. Association between frequency of drinking alcohol and chronic kidney disease in men. **Environmental Health and Preventive Medicine**, v. 17, p. 199-204, 2012.

GIGLIOTTI, A.; BESSA, M. A. Síndrome de dependência do álcool: critérios diagnósticos. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 26, p. 11-13, 2004.

GOCHMAN, E.; MAHAJNA, J.; REZNICK, A. Z. NF- κ B Activation by peroxynitrite through I κ B α -dependent phosphorylation versus nitration in colon cancer cells. **Anticancer Research**, v. 31, p. 1607-1618, 2011.

GOCHMAN, E. et al. The expression of iNOS and nitrotyrosine in colitis and colon cancer in humans. **Acta Histochemica**, v. 114, p. 827-835, 2012.

GOLIGORSKY, M. S.; BRODSKY, S. V.; NOIRI, E. Nitric oxide in acute renal failure: NOS versus NOS. **Kidney International**, v. 61, p. 855-861, 2002.

_____. NO bioavailability, endothelial dysfunction, and acute renal failure: new insights into pathophysiology. **Seminars in Nephrology**, v. 24, p. 316-323, 2004.

GONZAGA, N. A. et al. Acute ethanol intake induces mitogen-activated protein kinase activation, platelet-derived growth factor receptor phosphorylation, and oxidative stress in resistance arteries. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 70, p. 509-523, 2014.

GONZAGA, N. A. et al. Ethanol withdrawal increases oxidative stress and reduces nitric oxide bioavailability in the vasculature of rats. **Alcohol**, v. 49, p. 47-56, 2015.

GONZAGA, N. A. et al. Ethanol withdrawal increases blood pressure and vascular oxidative stress: a role for angiotensin type 1 receptors. **Journal of the American Society of Hypertension**, v. 12, p. 561-573, 2018.

GORIN, Y. Nox4 as a potential therapeutic target for treatment of uremic toxicity associated to chronic kidney disease. **Kidney International**, v. 83, p. 541-543, 2013.

GUADAGNIN, V. et al. Influence of oxidative stress on the regulation of vascular tone and the efficacy of antioxidant therapies. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v. 12, p. 82-89, 2015.

GULYA, K.; DAVE, J. R.; HOFFMAN, P. L. Chronic ethanol ingestion decreases vasopressin mRNA in hypothalamic and extrahypothalamic nuclei of mouse brain. **Brain Research**, v. 557, p. 129-135, 1991.

GULYA, K. et al. Prodynorphin and vasopressin mRNA levels are differentially affected by chronic ethanol ingestion in the mouse. **Molecular Brain Research**, v. 20, p. 1-8, 1993.

HALBACH, O. V. B. Nitric oxide imaging in living neuronal tissues using fluorescent probes. **Nitric Oxide**, v. 9, p. 217-228, 2003.

HANSSON, M.; OLSSON, I.; NAUSEEF, W. M. Biosynthesis, processing, and sorting of human myeloperoxidase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 445, p. 214-224, 2006.

HAORAH, J. et al. Mechanism of alcohol-induced oxidative stress and neuronal injury. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 45, p. 1542-1550, 2008.

HARRIS, P. S. et al. Chronic ethanol consumption induces mitochondrial protein acetylation and oxidative stress in the kidney. **Redox Biology**, v. 6, p. 33-40, 2015.

HECKMANN, G.; SILVEIRA, C. M. Dependência do álcool: aspectos clínicos e diagnósticos. IN: ANDRADE, A. G.; ANTHONY, J. C. **Álcool e suas consequências: uma abordagem multiconceitual**. 1. ed. Barueri: Minha editora, Barueri, São Paulo, 2009.

HEIDLAND, A. et al. Role of alcohol in clinical nephrology. **Klinische Wochenschrift**, v. 63, p. 948- 958, 1985.

HUSAIN, K. et al. Time response of alcohol-induced alterations in blood pressure, nitric oxide and oxidant to antioxidant balance in the plasma of rats. **Experimental and Clinical Cardiology**, v. 9, p. 229-234, 2004.

IIMURO, Y. et al. Antibodies to tumor necrosis factor alfa attenuate hepatic necrosis and inflammation caused by chronic exposure to ethanol in the rat. **Hepatology**, v. 26, p. 1530-1537, 1997.

INEU, R. F. et al. Antioxidant effect of zinc chloride against ethanol-induced gastrointestinal lesions in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 58, p. 522-529, 2013.

JALILI, C.; ROSHANKHAH, S.; SALAHSHOOR, M. R. Falcaria vulgaris extract attenuates ethanol-induced renal damage by reducing oxidative stress and lipid peroxidation in rats. **Journal of Pharmacy & BioAllied Sciences**, v. 11, p. 268-275, 2019.

JHA, J. C. et al. Genetic targeting or pharmacologic inhibition of NADPH oxidase Nox4 provides renoprotection in long-term diabetic nephropathy. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 25, p. 1237-1254, 2014.

JIANG, Y. et al. Stimulation of mammary tumorigenesis by systemic tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 4 gene delivery. **Cancer Research**, v. 61, p. 2365-2370, 2001.

JIANG, Y.; GOLDBERG, I. D.; SHI, Y. E. Complex roles of tissues inhibitors of metalloproteinases in cancer. **Oncogene**, v. 21, p. 2245-2252, 2002.

JORDÃO JÚNIOR, A. A. et al. Lipid peroxidation and ethanol: role of vitamin-E and glutathione. **Medicina**, v. 31, p. 434-449, 1998.

JORDÃO JÚNIOR, A. A. et al. Effect of methionine load on homocysteine levels, lipid peroxidation and DNA damage in rats receiving etanol. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, p. 709-714, 2009.

KAWARATANI, H. et al. The effect of inflammatory cytokines in alcoholic liver disease. **Mediators of Inflammation**, v. 2013, p. 1-10, 2013.

KHODO, S. N. et al. NADPH-oxidase 4 protects against kidney fibrosis during chronic renal injury. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 23, p. 1967-1976, 2012.

KIZILTAS, S. Toll-like receptors in pathophysiology of liver diseases. **World Journal of Hepatology**, v. 8, p. 1354-1369, 2016.

KOYAMA, S. Enhanced cell surface expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors, and tumor-induced host response in progression of human gastric carcinoma. **Digestive Diseases Sciences**, v. 49, p. 1621-1630, 2004.

LARUE-ACHAGIOTIS, C.; POUSSARD, A. M.; LOUIS-SYLVESTRE, J. Alcohol drinking, food and fluid intakes and body weight gain in rats. **Physiology and Behavior**, v. 47, p. 545-548, 1990.

LASH, L. H. Role of glutathione transport processes in kidney function. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 204, p. 329-342, 2005.

LATCHOUMYCANDANE, C.; NAGY, L. E.; MCINTYRE, T. M. Chronic ethanol ingestion induces oxidative kidney injury through taurine-inhibitable inflammation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 69, p. 403-416, 2014.

LEITE, L. N. et al. Ethanol-induced erectile dysfunction and increased expression of pro-inflammatory proteins in the rat cavernosal smooth muscle are mediated by NADPH oxidase-derived reactive oxygen species. **European Journal of Pharmacology**, v. 804, p. 82-93, 2017.

LELONGT, B. et al. Do matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 (gelatinases) play a role in renal development, physiology and glomerular diseases? **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, v. 10, p. 7-12, 2001.

LEY, K. et al. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade update. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, p. 678-689, 2007.

LIANG, Y.; ZHOU, Y.; SHEN, P. NF- κ B and its regulation on the immune system. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 1, p. 343-350, 2004.

LINARES, E. **Papel do peroxinitrito na atividade leishmanicida de macrófagos em modelos murinos**. 2003. 73 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

LIZARRAGA, F. et al. Tissue inhibitor of metalloproteinases-4 is expressed in cervical cancer patients. **Anticancer Research**, v. 25, p. 623-628, 2005.

LOIS, M. et al. Ethanol ingestion increases activation of matrix metalloproteinases in rat lungs during acute endotoxemia. **American Journal of Respiratory Critical Care Medicine**, v. 160, p. 1354-1360, 1999.

LU, Y.; CEDERBAUM, A. I. CYP2E1 and oxidative liver injury by alcohol. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 44, p. 723-738, 2008.

MADEIRA, M. D.; PAULA-BARBOSA M. M. Effects of alcohol on the synthesis and expression of hypothalamic peptides. **Brain Research Bulletin**, v. 48, p. 3-22, 1999.

MANDREKAR, P. et al. Human monocyte IL-10 production is increased by acute ethanol treatment. **Cytokine**, v. 8, p. 567-577, 1996.

MANDREKAR, P. et al. Moderate alcohol intake in humans attenuates monocyte inflammatory responses: inhibition of nuclear regulatory factor kappa B and induction of interleukin 10. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 30, p. 135-139, 2006.

MANDREKAR, P. et al. The opposite effects of acute and chronic alcohol on lipopolysaccharide-induced inflammation are linked to IRAK-M in human monocytes. **Journal of Immunology**, v. 183, p. 1320-1327, 2009.

MARCHI, K. C. et al. NADPH Oxidase plays a role on ethanol-induced hypertension and reactive oxygen species generation in the vasculature. **Alcohol and Alcoholism**, v. 51, p. 522-534, 2016.

MCCARTHY, E. T. et al. Ethanol at low concentrations protects glomerular podocytes through alcohol dehydrogenase and 20-HETE. **Prostaglandins and Other Lipid Mediators**, v. 216-217, p. 88-98, 2015.

MIGITA, K. et al. Peroxynitrite-mediated matrix metalloproteinase-2 activation in human hepatic stellate cells. **FEBS Letters**, v. 579, p. 3119-3125, 2005.

MOLINA, P. E. et al. Mechanisms of alcohol-induced tissue injury. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 27, p. 563-575, 2003.

MORISHITA, T. et al. Nephrogenic diabetes insipidus in mice lacking all nitric oxide synthase isoforms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, p. 10616-10621, 2005.

MUKHOPADHYAY, P. et al. Role of superoxide, nitric oxide, and peroxynitrite in doxorubicin-induced cell death in vivo and in vitro. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 296, p. H1466-H1483, 2009.

NAKASHIMA, M. A. et al. Chronic ethanol consumption increases reactive oxygen species generation and the synthesis of pro-inflammatory proteins in the heart through TNFR1-dependent mechanisms. **Cytokine**, v. 121, 2019.

NAUSEEF, W. M. Biosynthesis of human myeloperoxidase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 642, p. 1-9, 2018.

NEUPANE, S. P. et al. High frequency and intensity of drinking may attenuate elevated inflammatory cytokine levels of major depression in alcohol-use disorders. **CNS Neuroscience and Therapeutics**, v. 20, p. 898-904, 2014.

NOIRI, E. et al. Oxidative and nitrosative stress in acute renal ischemia. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v. 281, p. 948-957, 2001.

OKAMOTO, T. et al. Activation of human neutrophil procollagenase by nitrogen dioxide and peroxynitrite: a novel mechanism for procollagenase activation involving nitric oxide. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 342, p. 261-274, 1997.

OKAMOTO, T. et al. Activation of matrix metalloproteinases by peroxynitrite-induced protein S-glutathiolation via disulfide S-oxide formation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 29596-29602, 2001.

OKAMURA, D. M.; PENNATHUR, S. The balance of powers: redox regulation of fibrogenic pathways in kidney injury. **Redox Biology**, v. 6, p. 495-504, 2015.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **International guide for monitoring alcohol consumption and related harm**. Geneva: World Health Organization, 2000.

_____. **Global status report on alcohol 2004**. Geneva: World Health Organization, 2004.

_____. **Global status report on alcohol and health 2014**. Geneva: World Health Organization, 2014.

ORTIZ, P. A.; GARVIN, J. L. Cardiovascular and renal control in NOS-deficient mouse models. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 284, p. 628-638, 2003.

OYENIHI, O. R. et al. Hepato- and neuro-protective effects of watermelon juice on acute ethanol-induced oxidative stress in rats. **Toxicology Reports**, v. 3, p. 288-294, 2016.

OZBEK, E. Induction of oxidative stress in kidney. **International Journal of Nephrology**, v. 2012, p. 1-9, 2012.

PARAVICINI, T. M., TOUYZ, R. M. NADPH oxidases, reactive oxygen species and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. **Diabetes Care**, v. 31, p. 170-180, 2008.

PARTRIDGE, C. R.; SAMPSON, H. W.; FOROUGH, R. Long-term alcohol consumption increases matrix metalloproteinase-2 activity in rat aorta. **Life Sciences**, v. 65, 1395-1402, 1999.

PASCUAL, M.; FERNÁNDEZ-LIZARBE, S.; GUERRI, C. Role of TLR4 in ethanol effects on innate and adaptative immune responses in peritoneal macrophages. **Immunology and Cell Biology**, v. 89, p. 716-727, 2011.

PASSAGLIA, P. et al. Angiotensin type 1 receptor mediates chronic ethanol consumption-induced hypertension and vascular oxidative stress. **Vascular Pharmacology**, v. 74, p. 49-59, 2015.

PAUTZ, A. et al. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. **Nitric Oxide**, v. 23, p. 75-93, 2010.

PERES, J. A. B. et al. Biomarkers of acute kidney injury. **Brazilian Journal of Nephrology**, v. 35, p. 229-236, 2013.

PETRASEK, J. et al. IL-1 receptor antagonist ameliorates inflammasome-dependent alcoholic steatohepatitis in mice. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 122, p. 3476-3489, 2012.

POPOLO, A. et al. Oxidative stress in patients with cardiovascular disease and chronic renal failure. **Free Radical Research**, v. 47, p. 346-356, 2013.

QIAN J. et al. Nitrotyrosine level was associated with mortality in patients with acute kidney injury. **PLoS ONE**, v. 8, p. e79962, 2013.

QUINTAES, P. S. L.; NORONHA, I. L. Revisão/atualização em insuficiência renal aguda: papel dos neutrófilos e moléculas de adesão na fisiopatologia da insuficiência renal aguda isquêmica. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 20, p. 74-77, 1998.

RAMESH, G.; REEVES, W. B. TNF- α mediates chemokine and cytokine expression and renal injury in cisplatin nephrotoxicity. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 110, p. 835-842, 2002.

RESSTEL, L. B. M. et al. Increased circulating vasopressin may account for ethanol-induced hypertension in rats. **American Journal of Hypertension**, v. 21, p. 930-935, 2008.

RODRIGO, R.; RIVERA, G. Renal damage mediated by oxidative stress: a hypothesis of protective effects of red wine. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 33, p. 409-422, 2002.

ROMANO, M. et al. Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. **Immunity**, v. 6, p. 315-25, 1997.

RONCO, R. P.; CHATZIANTONIOU, C. Matrix metalloproteinases and matrix receptors in progression and reversal of kidney disease: therapeutic perspectives. **Kidney International**, v. 74, p. 873-878, 2008.

RORK, T. H. et al. Acetaminophen attenuates peroxynitrite-activated matrix metalloproteinase-2-mediated troponin I cleavage in the isolated guinea pig myocardium. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 40, p. 553-561, 2006.

SANTANGELO, F. et al. Restoring glutathione as a therapeutic strategy in chronic kidney disease. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 19, p. 1951-1955, 2004.

SARAVANAN, N.; NALINI, N. Impact of *Hemidesmus indicus* R.Br. extract on ethanol-mediated oxidative damage in rat kidney. **Redox Report**, v. 12, p. 229-235, 2007.

SECRETARIA NACIONAL DE POLÍTICAS SOBRE DROGAS (SENAD). **I Levantamento nacional sobre os padrões de consumo de álcool na população brasileira**. Brasília: Ministério da Justiça, SENAD, 2007.

_____. **Prevenção ao uso indevido de drogas: capacitação para conselheiros e lideranças comunitárias**. 4. ed. Brasília: Ministério da Justiça, SENAD, 2011.

SEDEEK, M. et al. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and the kidney: friend and foe. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 24, p. 1512-1518, 2013.

SHANMUGAM, K. R. et al. Protective effect of ginger against alcohol-induced renal damage and antioxidant enzymes in male albino rats. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 48, p. 143-149, 2010.

SHARMA, S. P. Nitric oxide and the kidney. **Indian Journal of Nephrology**, v. 14, p. 77-84, 2004.

SILLANAUKKEE, P. et al. Matrix metalloproteinase-9 is elevated in serum of alcohol abusers. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 32, p. 225-229, 2002.

SILVA, S. M.; PAULA-BARBOSA M. M.; MADEIRA, M. D. Prolonged alcohol intake leads to reversible depression of corticotropin-releasing hormone and vasopressin immunoreactivity and mRNA levels in the parvocellular neurons of the paraventricular nucleus. **Brain Research**, v. 954, p. 82-93, 2002.

SILVA, T. P. et al. 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.

SIMPLICIO, J. A. et al. Contribution of oxidative stress and prostanoids in endothelial dysfunction induced by chronic fluoxetine treatment. **Vascular Pharmacology**, v. 73, p. 124-137, 2015.

SIMPLICIO, J. A. et al. Tumor necrosis factor- α receptor 1 contributes to ethanol-induced vascular reactive oxygen species generation and hypertension. **Journal of the American Society of Hypertension**, p. 1-13, 2017.

SINDHU, R. K. et al. Expression of catalase and glutathione peroxidase in renal insufficiency. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1743, p. 86-92, 2005.

SINGH, K.; AHLUWALIA, P. Effect of monosodium glutamate on lipid peroxidation and certain antioxidant enzymes in cardiac tissue of alcoholic adult male mice. **Journal of Cardiovascular Disease Research**, v. 3, p. 12-18, 2012.

SMATHERS, R. L. et al. Susceptibility of L-FABP^{-/-} mice to oxidative stress in early-stage alcoholic liver. **Journal of Lipid Research**, v. 54, p. 1335-1345, 2013.

SRIVASTAVA, V. K. et al. Effects of ethanol on intraovarian nitric oxide production in the prepubertal rat. **Journal of Endocrinology**, v. 161, p. 69-75, 1999.

SUNG, M. M. et al. Matrix metalloproteinase-2 degrades the cytoskeletal protein α -actinin in peroxynitrite mediated myocardial injury. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 43, p. 429-436, 2007.

SWARNAKAR, S. et al. Matrix metalloproteinase-9 activity and expression. Is reduced by melatonin during prevention of ethanol-induced gastric ulcer in mice. **Journal of Pineal Research**, v. 43, p. 56-64, 2007.

SZABO, G. et al. Effect of ethanol on inflammatory responses: implications for pancreatitis. **Pancreatology**, v. 7, p. 115-123, 2007.

SZABO, G. et al. The unfolding web of innate immune dysregulation in alcoholic liver injury. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 35, p. 782-786, 2011.

TAKAC, I. et al. The E-loop is involved in hydrogen peroxide formation by the NADPH oxidase Nox4*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, p. 13304-13313, 2011.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern recognition receptors and inflammation. **Cell**, v. 140, p. 805-820, 2010.

THURAISINGHAM, R.C. et al. Increased nitrotyrosine staining in kidneys from patients with diabetic nephropathy. **Kidney International**, v. 57, p. 1968-1972, 2000.

TIRAPELLI, C. R. et al. Gender-specific vascular effects elicited by chronic ethanol consumption in rats: a role for inducible nitric oxide synthase. **British Journal of Pharmacology**, v. 153, p. 468-479, 2008.

TIRAPELLI, L. F. et al. Chronic ethanol consumption induces histopathological changes and increases nitric oxide generation in the rat liver. **Tissue and Cell**, v. 43, p. 384-391, 2011.

TIRAPELLI, L. F. et al. Ethanol consumption increases the expression of endothelial nitric oxide synthase, inducible nitric oxide synthase and metalloproteinases in the rat kidney. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 64, p. 68-76, 2012.

TONINI, C. L. et al. Effects of aging and hypercholesterolemia on oxidative stress and DNA damage in bone marrow mononuclear cells in apolipoprotein E-deficient mice. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, p. 3325-3342, 2013.

TOUYZ, R. M., BRIONES, A. M. Reactive oxygen species and vascular biology: implications in human hypertension. **Hypertension Research**, v. 34, p. 5-14, 2011.

TOUYZ, R. M.; SCHIFFRIN, E. L. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. **Pharmacological Reviews**, v. 52, p. 639-672, 2000.

TUNUGUNTALA, R. et al. Expression of matrix metalloproteinase-26 and tissue inhibitors of metalloproteinases TIMP-3 and -4 in benign endometrium and endometrial cancer. **Gynecologic Oncology**, v. 89, p. 453-459, 2003.

URBSCHAT, A.; OBERMÜLLER, N.; HAFERKAMP, A. Biomarkers of kidney injury. **Biomarkers**, v. 16, p. S22-S30, 2011.

URSO, T.; GAVALER, J. S.; VAN THIEL, D. H. Blood ethanol levels in sober alcohol users seen in an emergency room. **Life Sciences**, v. 28, p. 1053-1056, 1981.

US Department of Health and Human Services and US Department of Agriculture. **2015–2020 Dietary Guidelines for Americans**. 8th Edition. 2015. Disponível em: <<http://health.gov/dietaryguidelines/2015/guidelines/>>. Acesso em: 9 de Agosto, 2018.

VALE, G. T. et al. Nebivolol prevents ethanol-induced reactive oxygen species generation and lipoperoxidation in the rat kidney by regulating NADPH oxidase activation and expression. **European Journal of Pharmacology**, v. 799, p. 33-40, 2017.

VALE, G. T. et al. Nebivolol prevents vascular oxidative stress and hypertension in rats chronically treated with ethanol. **Atherosclerosis**, v. 274, p. 67-76, 2018.

VENKOV, C. D. et al. Ethanol increases endothelial nitric oxide production through modulation of nitric oxide synthase expression. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 81, p. 638-642, 1999.

VIAPPIANI, S. et al., Activation and modulation of 72 kDa matrix metalloproteinase-2 by peroxynitrite and glutathione. **Biochemical Pharmacology**, v. 77, p. 826-834, 2009.

VOISIN, V. et al. Protection of Wistar-Furth rats from post-ischemic acute renal injury: a role for nitric oxide and thromboxane? **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 41, p. 911-920, 2014.

WATANABE, H. et al. p-Cresyl sulfate causes renal tubular cell damage by inducing oxidative stress through the activation of NADPH oxidase. **Kidney International**, v. 83, p. 582-592, 2013.

WINTERBOURN, C. C. The challenges of using fluorescent probes to detect and quantify specific reactive oxygen species in living cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1840, p. 730-738, 2014.

WU, D.; CEDERBAUM, A. I. Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. **Alcohol Research and Health**, v. 27, p. 277-284, 2003.

YEOMANS, M. R. Effects of alcohol on food and energy in human subjects: evidence for passive and active over-consumption of energy. **British Journal of Nutrition**, v. 92, p. S31-S34, 2004.

YOGI, A. et al. Ethanol-induced vasoconstriction is mediated via redox-sensitive cyclooxygenase-dependent mechanisms. **Clinical Science**, v. 118, p. 657-668, 2010.

YONG, V. W. et al. Matrix metalloproteinases and diseases of the CNS. **Trends Neurosciences**, v. 21, p. 75-80, 1998.

YUAN, G. J. et al. Expression and activity of inducible nitric oxide synthase and endothelial nitric oxide synthase correlate with ethanol-induced liver injury. **World Journal of Gastroenterology**, v. 12, p. 2375-2381, 2006.

ZAGO, A. et al. Alcohol use disorder and inflammatory cytokines in a population sample of young adults. **Journal of Alcoholism and Drug Dependence**, v. 4, p. 1-5, 2016.

ZAKHARI, S. Overview: how is alcohol metabolized by the body? **Alcohol Research and Health**, v. 29, p. 245-254, 2006.

ZELKO, I. G.; MARIANI, T. J.; FOLZ, R. J. Superoxide dismutase multigene Family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 33, p. 337-349, 2002.

ZHAO, H. et al. Superoxide reacts with hydroethidine but forms a fluorescent product that is distinctly different from ethidium: potential implications in intracellular fluorescence detection of superoxide. **Free Radical Biological and Medicine**, v. 11, p. 1359-1368, 2003.

ZHU, Y. et al. The expressional disorder of the renal RAS mediates nephrotic syndrome of male rat offspring induced by prenatal ethanol exposure. **Toxicology**, v. 400-401, p. 9-19. 2018.