

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

**Consumo de etanol induz fenótipo pró-contrátil em tecido adiposo perivascular de artérias de resistência: Participação dos receptores mineralocorticóides.**

**Ivis Vinicius de Oliveira Martins**

**Ribeirão Preto**

**2023**

IVIS VINICIUS DE OLIVEIRA MARTINS

**Consumo de etanol induz fenótipo pró-contrátil em tecido adiposo perivascular de artérias de resistência: Participação dos receptores mineralocorticóides.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Carlos Renato Tirapelli

Ribeirão Preto

2023

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

## **FICHA CATALOGRÁFICA**

Preparada pela Biblioteca Central do Campus Administrativo de  
Ribeirão Preto/USP

Martins-Oliveira, Ivis Vinicius

Consumo de etanol induz fenótipo pró-contrátil em tecido adiposo perivascular de artérias de resistência: Participação dos receptores mineralocorticóides. Ribeirão Preto, 2023.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Titapelli, Carlos Renato.

1. Estresse oxidativo
2. Receptores Receptores Mineralocorticoides.
3. Etanol.
4. Sistema cardiovascular.
5. Tecido adiposo perivascular (PVAT)

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Ivis Vinicius de Oliveira Martins

Título: Consumo de etanol induz fenótipo pró-contrátil em tecido adiposo perivascular de artérias de resistência: Participação dos receptores mineralocorticóides.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Farmacologia

Aprovado em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

### BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr.:

Instituição:

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr.:

Instituição:

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr.:

Instituição:

Assinatura: \_\_\_\_\_

Dedico esse trabalho aos que estiveram sempre comigo, mesmos distantes fisicamente, meus pais Helenita e Reginaldo.

## AGRADECIMENTOS

Aba, obrigado por tudo, nunca conseguirei retribuir tamanho amor que tens por mim, sou eternamente grato por estar comigo em todos os meus passos, me guiado por durante todo os caminhos, e pelas portas que se abriam no decorrer dele.

Não tenho como agradecer por todo suporte que me deram para chegar até aqui. Foram tantos obstáculos, tantos dias difíceis, a saudade, a renúncia que foi muito grande, mesmo distante se fizeram tão presentes, dando todo apoio possível, sem vocês não seria possível. Meus pais Helenita e Reginaldo, como sempre falo vocês são meus alicerces, minha base, meus exemplos de amor, honestidade, humildade, mais uma vez obrigado por tudo. Foram pouco mais de dois anos, de muitos dias difíceis, esforço, trabalho, alguns de despedida de lágrimas nos olhos, abraços longos apertados, mas conseguimos, no final da trajetória nós vencemos, meus amores obrigados por tudo. Agradeço também ao meu irmão Joao Marcelo, obrigado por todo companheirismo e amizade, aos meus avos Maria de Deus e Simplício, por sempre se preocuparem comigo e por todo carinho. Ao meu tio Elon por todo incentivo, e por sempre está me incentivando a ir mais longe.

Agradeço também a outra pessoa de muita importância nesse ciclo meu orientador Prof. Dr. Carlos Renato Tirapelli, obrigado pela sua grande orientação, confiança, e por sempre estar presente, buscando sempre agregar ideias para o melhor do presente estudo. Na minha evolução, e aprendizado até aqui, você com sua paciência e sabedora, estiveram um lugar especial.

Aos membros do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular, obrigado por todo o companheirismo e amizade, em especial Thales, Gustavo e Vitor e Wanessa. Thales, como sou muito grato a você, foi uma amizade incrível que Deus colocou no tempo certo no meu caminho, obrigado por cada ensinamento, palavras de incentivos, pelo conhecimento transmitido, pela paciência e por sempre está ajudando ao longo desses dois anos mesmo nos dias difíceis, você tem o coração gigante amigo. Ao Gustavo, você é uma pessoa incrível, obrigado pelos conselhos, e também pela ajuda, durante rotina laboratorial sua presença deixava, os dias mais leves, sou muito grato pela nossa amizade que foi crescendo ao longo dos dias. Victor, obrigado por seus conselhos, pela sua paciência, e pela sua disposição em sempre está ajudando, você também foi fundamental. Não posso deixar de agradecer também a Wanessa, você é luz, uma das primeiras pessoas que conheci no laboratório, obrigado por todo conhecimento repassado, amizade, pode

ter certeza que você é uma das minhas inspirações de profissionalismo. Vocês foram pessoas impas que Deus colocou na minha vida, levarei um pouco de cada um de vocês no meu coração, obrigado por tudo gente.

Aos meus amigos do Piauí: Eliane, Thaislany, Armando, Leonel, Álvaro, Praxedes, Tania, Glaydiane, obrigado por sempre me darem palavras de força, animo, e incentivo nos dias bons e difíceis mesmo estando a quilômetros de distância, sempre se fizeram presentes, vocês conhecem minha história, a vocês deixo aqui minha grande gratidão. Não posso deixar de agradecer ao meu orientador de iniciação científica da graduação, prof. Dr. Joubert Aires de Sousa, que sempre incentivou a pesquisa científica, você é um referencial, minha grande inspiração de profissionalismo e ética, obrigado pelos seus ensinamentos.

Deixo também meus agradecimentos ao programa de pós-graduação em farmacologia por todo suporte e atenção durante a realização do mestrado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“Sempre que o tempo de Deus contrariou o meu, no final Ele estava certo. Eu faço minha parte, mas não há mérito, há graça. Porque, mesmo com todo mérito do mundo, no final, as coisas dão certo ou errado por questão de sorte. Por questão de graça. Por questão de Deus”.

Samer Agi



## RESUMO

**Consumo de etanol induz fenótipo pró-contrátil em tecido adiposo perivascular de artérias de resistência: Participação dos receptores mineralocorticoides.** Dissertação (Mestrado). <sup>1</sup>Martins, I.V.O. <sup>1</sup>Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

O consumo crônico de etanol é um fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares como a hipertensão arterial. O mecanismo pelo qual o etanol induz aumento envolve a participação de sistemas que estão diretamente relacionados ao controle da pressão arterial com o sistema nervoso autônomo simpático (SNAS) e o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA). O consumo de etanol também promove alterações vasculares que levam ao aumento da contratilidade. Níveis aumentados de angiotensina II (ANGII) e aldosterona foram descritos em estudos clínicos e experimentais após consumo de etanol. A aldosterona atua em receptores mineralocorticoides (MR) no vaso e no tecido adiposo perivascular (*perivascular adipose tissue* - PVAT) promovendo aumento do estresse oxidativo e da síntese de citocinas pró-inflamatórias. A hipótese do presente estudo foi a de que os MR participariam da disfunção vascular promovida pelo etanol induzindo aumento das espécies reativas de oxigênio (ERO) com consequente indução de um fenótipo pró-contrátil do PVAT. Assim, avaliamos a participação dos MR nas alterações do balanço redox e do fenótipo do PVAT induzidas pelo consumo crônico de etanol. Foram utilizados Ratos *Wistar Hannover* adultos, com idade entre 50 e 70 dias (260-280g). Os animais foram tratados com solução de etanol por 5 semanas e o canrenoato de potássio (30 mg/kg/dia; gavagem), um antagonista dos MR (MRA), foi usado para avaliar a participação dos MR nas alterações induzidas pelo etanol. O aumento da pressão arterial média, diastólica e sistólica induzido pelo etanol foi prevenido pelo carenoato de potássio. O tratamento com etanol aumentou as concentrações circulantes de aldosterona, efeito que não foi prevenido pelo tratamento com MRA. O consumo de etanol não promoveu alteração da contração induzida por fenilefrina (em artérias mesentéricas com ou sem PVAT), mas promoveu redução do relaxamento induzido pela acetilcolina em artérias mesentéricas com PVAT. O MRA preveniu essa resposta. Aumentos da produção de ERO e de lipoperoxidação foram evidenciados no leito arterial mesentérico (LAM) e no PVAT de animais tratados com etanol e o MRA preveniu esses efeitos. O etanol diminuiu a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) no LAM, mas não no PVAT, tendo esse efeito sido prevenido pelo MRA. O tratamento com etanol reduziu as concentrações de leptina no PVAT e o MRA preveniu essa resposta. O etanol aumentou os níveis de TNF- $\alpha$  no LAM e no PVAT e o tratamento com canrenoato de potássio preveniu esse efeito. Aumento da atividade da mieloperoxidase (MPO) foi detectado no PVAT de animais tratados com etanol e o MRA preveniu esse efeito. Nossos resultados evidenciam a participação dos MR no aumento da pressão arterial e nas disfunções vascular e do PVAT induzidas pelo consumo de etanol. Os MR modulam a indução de um fenótipo pró-contrátil do PVAT por um mecanismo que envolve o aumento da produção de ERO, via NADPH oxidase, e redução da concentração de leptina. O fenótipo pró-contrátil do PVAT também está

associado a ações pró-inflamatórias mediadas pelos MR que envolvem aumento de TNF- $\alpha$  e de neutrófilos no PVAT. Os MR também participam das alterações de estado redox em vasos de resistência que foram caracterizadas por aumento de ERO, lipoperoxidação e redução da capacidade antioxidante enzimática. Assim, concluímos que os MR desempenham importante função nas alterações vasculares induzidas pelo consumo de etanol.

Apoio Financeiro: CAPES.

**Palavras-chave:** Etanol; Receptores mineralocorticoides (MR); Estresse oxidativo; PVAT; Disfunção vascular.

## ABSTRACT

MARTINS-OLIVEIRA, IVIS VINICIUS. **Ethanol consumption induces procontractile phenotype in perivascular adipose tissue of resistance arteries: Participation of mineralocorticoid receptors.** 2023. Master Thesis (Msc.). Ribeirao Preto Medical School of the University of São Paulo, Ribeirão Preto. 2023.

Chronic consumption of ethanol is a risk factor for the development of cardiovascular diseases such as hypertension. The mechanism by which ethanol induces increase involves the participation of systems that are directly related to blood pressure control with the sympathetic autonomic nervous system (SNAS) and the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS). Ethanol consumption also promotes vascular changes that lead to increased contractility. Increased levels of angiotensin II (ANGII) and aldosterone have been described in clinical and experimental studies after ethanol consumption. Aldosterone acts on mineralocorticoid receptors (MR) in the vessel and perivascular adipose tissue (PVAT) promoting increased oxidative stress and synthesis of pro-inflammatory cytokines. The hypothesis of the present study was that MRs would participate in the vascular dysfunction promoted by ethanol by inducing an increase in reactive oxygen species (ROS) with consequent induction of a pro-contractile phenotype of PVAT. Thus, we evaluated the participation of MR in changes in redox balance and PVAT phenotype induced by chronic ethanol consumption. Adult Wistar Hannover rats, aged 50-70 days (260-280g), were used. Animals were treated with ethanol solution for 5 weeks and potassium canrenoate (30 mg/kg/day; gavage), an MR antagonist (MRA), was used to evaluate the participation of MR in ethanol-induced changes. The ethanol-induced increase in mean, diastolic and systolic blood pressure was prevented by potassium carenoate. Ethanol treatment increased circulating concentrations of aldosterone, an effect that was not prevented by treatment with MRA. Ethanol consumption did not promote alteration of phenylephrine-induced contraction (in mesenteric arteries with or without PVAT), but promoted reduction of acetylcholine-induced relaxation in mesenteric arteries (MAB) with PVAT. MRA prevented this response. Increases in ROS production and lipoperoxidation were evidenced in the mesenteric arterial bed (MAB) and PVAT of ethanol-treated animals, and MRA prevented these effects. Ethanol decreased superoxide dismutase (SOD) enzyme activity in the MAB but not in the PVAT, and this effect was prevented by MRA. Ethanol treatment reduced leptin concentrations in PVAT and ARM prevented this response. Ethanol increased TNF- $\alpha$  levels in MAB and PVAT and potassium canrenoate treatment prevented this effect. Increased myeloperoxidase (MPO) activity was detected in the PVAT of ethanol-treated animals and ARM prevented this effect. Our results highlight the participation of MR in the increased blood pressure and vascular and PVAT dysfunction induced by ethanol consumption. MR modulate the induction of a pro-contractile phenotype of PVAT by a mechanism involving increased production of ROS, via NADPH oxidase, and reduced leptin concentration in PVAT and MRA prevented this response. Ethanol increased TNF- $\alpha$  levels in MAB and PVAT and potassium canrenoate treatment prevented this effect. Increased myeloperoxidase (MPO) activity was detected in the PVAT of ethanol-treated animals and MRA prevented this effect. Our results

highlight the participation of MR in the increased blood pressure and vascular and PVAT dysfunction induced by ethanol consumption. MR modulate the induction of a pro-contractile phenotype of PVAT by a mechanism involving increased production of ROS, via NADPH oxidase, and reduced leptin concentration. The pro-contractile phenotype of PVAT is also associated with MR-mediated pro-inflammatory actions that involve increased TNF- $\alpha$  and neutrophils in PVAT. MRs also participate in redox state changes in resistance vessels that were characterized by increased ROS, lipoperoxidation, and reduced enzymatic antioxidant capacity. Thus, we conclude that MRs play an important role in the vascular changes induced by ethanol consumption.

Financial Support: CAPES.

**Keywords:** Ethanol; Mineralocorticoid receptors (MR); Oxidative stress; PVAT; Vascular dysfunction.

# Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2. HIPÓTESE E OBJETIVOS</b> .....	<b>21</b>
<b>3. MÉTODOS</b> .....	<b>22</b>
3.1. ANIMAIS .....	22
3.2. GRUPOS EXPERIMENTAIS .....	22
3.3. AVALIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES SERICAS DE ALDOSTERONA .....	24
3.4. AVALIAÇÃO DA PRESSÃO POR CANULAÇÃO DA ARTÉRIA FEMURAL .....	24
3.5. ESTUDO FUNCIONAL DA REATIVIDADE VASCULAR EM LAM COM OU SEM PVAT .....	24
3.6. AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO VASCULAR .....	25
3.6.1. Determinação da geração de O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> .....	25
3.6.2. Determinação da concentração tecidual de MDA .....	25
3.6.3. Determinação da concentração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	26
3.6.4. Determinação da atividade da super oxído dismutase (SOD) .....	26
3.6.5. Determinação da atividade da catalase .....	26
3.6.6. Determinação da atividade glutathiona redutase (GSH) .....	27
3.7. AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ADIPOCINAS NO PVAT .....	27
3.7.1. Determinação da concentração de adiponectina no PVAT .....	27
3.7.2. Determinação da concentração de leptina no PVAT .....	28
3.8. AVALIAÇÃO DE MEDIADORES PRÓ-INFLAMATÓRIOS VASCULARES, E INFILTRAÇÃO DE NEUTROFILOS E MACROFAGOS .....	26
3.8.1. Determinação das concentrações teciduais de TNF- $\alpha$ .....	28
3.8.2. Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO) .....	29
3.8.3. Determinação da atividade da n-acetilglicosqminidase (NAG) .....	29
3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	29
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>31</b>
4.1. AVALIAÇÃO DO PESO CORPORAL E DO CONSUME DE RAÇÃO E LÍQUIDO .....	31

4.2. AVALIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES CIRCULANTES DE ALDOSTERONA .....	31
4.3. AVALIAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL (PAM), PRESSÃO SISTÓLICA, PRESSÃO DIASTÓLICA E FREQUÊNCIA CARDÍACA .....	32
4.4. ESTUDO FUNCIONAL DA REATIVIDADE VASCULAR EM LAM COM OU SEM PVAT.....	33
4.5. AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO VASCULAR .....	35
4.5.1. Determinação da geração de $O_2^{\bullet-}$ .....	35
4.5.2. Avaliação da concentração de MDA .....	36
4.5.3. Avaliação da concentração de $H_2O_2$ .....	36
4.5.4. Determinação da atividade da super oxido dismutase (SOD) .....	37
4.5.5. Determinação da atividade da Catalase .....	37
4.5.6. Determinação da atividade da glutathione redutase (GSH) .....	38
4.6. AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE APOCININAS .....	38
4.6.1. Determinação da concentração de adiponectina e leptina .....	38
4.7. AVALIAÇÃO DE MEDIADORES PRÓ-INFLAMATÓRIOS VASCULARES, E INFILTRAÇÃO DE NEUTROFILOS E MACROFAGOS .....	39
4.7.1. Avaliação da concentração de TNF - $\alpha$ .....	39
4.7.2. Avaliação da concentração de MPO e NAG .....	39
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>41</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>48</b>
<b>7. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>49</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A associação positiva entre o consumo de etanol e o aumento da pressão arterial foi mostrada pela primeira vez no ano de 1915, pelo médico Camile Lian (Lian, 1915 em MacMahon, 1987). Atualmente o consumo de etanol figura como importante fator de risco no desenvolvimento da hipertensão arterial visto que induz alterações no coração e vasos (Mathews, 1976; Klatsky *et al.*, 1977,1986; MacMahon, 1987; Fuchs *et al.*, 2001; Souza, 2014; Almeida *et al.*, 2016; Piano, 2017). As ações cardiovasculares do etanol estão diretamente relacionadas à quantidade e frequência de ingestão desse composto. Assim, foi descrito que a associação entre a quantidade de etanol consumida e o aumento da pressão arterial é do tipo J, ou seja, o consumo de pequena quantidade de etanol induz redução da pressão arterial enquanto o consumo de altas concentrações induz hipertensão arterial (Klatsky *et al.*, 1977, 1986; MacMahon, 1987; O’Keefe *et al.*, 2018). O consumo de etanol é quantificado em termos da quantidade de doses ingeridas durante um dia sendo que uma dose equivale a 14 gramas de etanol (Andrade, 2021). No contexto brasileiro, uma dose (ou 14 gramas de etanol) corresponde a 350 mL de cerveja, 150 mL de vinho ou 40 mL de uma bebida destilada (Andrade, 2021). Em relação aos efeitos pressóricos do etanol, é descrito que o consumo moderado (entre três e cinco doses diárias) ou abusivo de etanol (superior a seis doses diárias) está associado ao aumento da pressão sistólica (>150-160 mmHg) e diastólica (>95 mmHg), enquanto o consumo de uma ou duas doses diárias não induz alteração dos valores de pressão arterial (Klatsky *et al.*, 1977; O’Keefe *et al.*, 2018).

Os achados clínicos e epidemiológicos mostrando que o consumo de etanol induz hipertensão arterial em humanos foram também constatados em modelos experimentais (Chan e Sutter, 1983; Tirapelli *et al.*, 2008; Da Silva *et al.*, 2013; Passaglia *et al.*, 2015; Marchi *et al.*, 2016). Os estudos experimentais permitiram aprofundamento do conhecimento em relação aos mecanismos responsáveis pelo aumento da pressão arterial induzido pelo etanol. Alterações na contratilidade vascular e neuro-humorais figuram como dois importantes mecanismos pelos quais o consumo de etanol induz aumento da pressão arterial. Assim, a hipercontratilidade vascular foi descrita em diferentes territórios vasculares em animais tratados cronicamente com etanol (Pinaridi *et al.*, 1992; Hatton *et al.*, 1992; Stewart e Kennedy, 1999; Tirapelli *et al.*, 2006; 2008). O aumento da disponibilidade de  $Ca^{2+}$  intracelular assim como da produção de espécies

reativas de oxigênio (ERO) são dois importantes mecanismos pelos quais o etanol promove o aumento da contratilidade vascular a diferentes agentes vasoativos (Tirapelli *et al.*, 2006; Marchi *et al.*, 2016; Ceron *et al.*, 2017; Do Vale *et al.*, 2018). A redução do relaxamento vascular decorrente de disfunção endotelial também foi identificada após consumo de etanol (Tirapelli *et al.*, 2008; Husain *et al.*, 2008; Hipolito *et al.*, 2011; Rocha *et al.*, 2012). A disfunção endotelial induzida pelo etanol é decorrente do aumento da produção de ERO, resposta essa que está diretamente relacionada à redução da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO), um importante mediador do relaxamento vascular (Tirapelli *et al.*, 2008; Simplicio *et al.*, 2017).

O sistema nervoso autônomo simpático (SNAS) em conjunto com o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) é responsável pelo controle fisiológico da pressão arterial. O consumo de etanol induz ativação de ambos, fato que sugere um mecanismo neuroendócrino na hipertensão arterial induzida pelo etanol (Nieminen *et al.*, 1981; Polikandriotiset *et al.*, 2006; Husain *et al.*, 2008; Da Silva *et al.*, 2013). De fato, Do Vale *et al.* (2018) mostraram que existe relação direta entre esses dois sistemas na modulação do aumento da pressão arterial induzido pelo etanol, onde o SNAS é responsável pela ativação do SRAA, que atua como mediador final da alteração vascular induzida pelo etanol (Passaglia *et al.*, 2015; Ceron *et al.*, 2017). Assim, constatou-se a existência de relação direta entre os dois principais mecanismos apontados como mediadores da hipertensão arterial induzida pelo etanol.

No SRAA clássico, a angiotensina I (ANGI) é formada a partir do angiotensinogênio, uma proteína sintetizada pelo fígado que serve de substrato para a enzima renina que é produzida nas células justaglomerulares. A enzima conversora da angiotensina (ECA) cliva o decapeptídeo ANGI gerando o octapeptídeo angiotensina II (ANGII), que é considerada como a principal efetora biológica desse sistema (Carey, 2013). A ANGII promove seus efeitos biológicos via ativação dos receptores AT1 e AT2. O receptor AT1 é responsável pelas principais ações da ANGII como vasoconstrição, proliferação, crescimento e diferenciação celular, aumento da atividade simpática e secreção de aldosterona, hormônio produzido na zona glomerulosa das glândulas adrenais (Touyz e Schiffrin, 2000; Hattangady *et al.*, 2012; Ames *et al.*, 2019). A principal ação biológica da aldosterona é a de estimular a reabsorção de sódio (Na<sup>+</sup>) no ducto coletor dos néfrons. Para promover essa ação, o hormônio ativa os receptores mineralocorticóides (MR) e induz aumento na expressão dos canais epiteliais



de Na<sup>+</sup> (ENaC) e consequente aumento do volume extracelular e pressão arterial média (Hall, 2017; Colafella *et al.*, 2019). Os MR não são expressos exclusivamente nos néfrons sendo também encontrados em células do sistema imunológico, coração e vasos sanguíneos onde estão associados à mediação de ações fisiopatológicas da aldosterona. Assim, além de promover efeitos fisiológicos, a aldosterona está associada a diferentes efeitos vasculares prejudiciais incluindo inflamação, remodelamento, estresse oxidativo que, em conjunto, levam à disfunção vascular (Van der Heijden *et al.*, 2018; Colafella *et al.*, 2019). De fato, a aldosterona é responsável pela disfunção vascular observada em diferentes condições incluindo a obesidade, hipertensão arterial e diabetes. Por exemplo, em modelo de hipertensão arterial induzido pela ANGII, o uso de espironolactona, um antagonista dos MR, promoveu redução do dano vascular e estresse oxidativo (Virdis *et al.*, 2002). Antagonistas dos MR se mostraram efetivos em promover cardioproteção na hipertensão arterial (Nakano *et al.*, 2005). O bloqueio dos MR também restaurou o relaxamento vascular induzido pelo NO e promoveu redução das ERO na obesidade e diabetes, fato que mostra a participação direta da aldosterona nessas respostas (Silva *et al.*, 2015; Cat *et al.*, 2018).

É importante destacar que o consumo crônico de etanol promove ativação do SRAA (Da Silva *et al.*, 2013; Do Vale *et al.*, 2018), e que o bloqueio dos receptores AT1 previne o aumento da pressão arterial e a disfunção vascular, assim como o aumento dos níveis circulantes de aldosterona induzido pelo etanol (Passaglia *et al.*, 2015; Ceron *et al.*, 2017). O aumento do estresse oxidativo induzido pelo SRAA é um importante mecanismo pelo qual esse sistema induz disfunção vascular. O SRAA leva à ativação da enzima adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase, que nos vasos tem como principal função a produção de ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) a partir da redução do oxigênio usando NADPH ou NADH como doadores de elétron (Touyz e Briones, 2011; Hussain, 2018).

A NADPH oxidase é um complexo enzimático formado por subunidades de membrana e citosólicas sendo que as subunidades catalíticas (localizadas na membrana) podem não requerer regulação ou serem reguladas por proteínas citosólicas ou pelo Ca<sup>2+</sup> (Rodríguez-Janeiro *et al.*, 2013; Altenhöfer *et al.*, 2014; Vermot *et al.*, 2021). Sete membros da “família Nox” das NADPH oxidases são conhecidos e caracterizados de acordo com as subunidades catalíticas que os compõem: Nox1, Nox2 (ou gp91phox), Nox3, Nox4 (ou renox – renal oxidase – oxidase renal), Nox5 e Duox1 e Duox2 (Rodríguez-Janeiro *et*

*al.*, 2013). As células endoteliais, do músculo liso vascular assim como do tecido adiposo perivascular (perivascular adipose tissue – PVAT) expressam diferentes isoformas da NADPH oxidase e por esse motivo são capazes de promover a geração de ERO (Drummond *et al.*, 2011; Cheng *et al.*, 2018). O  $O_2^{\cdot-}$  formado na vasculatura pode reagir com o NO tendo essa reação as seguintes consequências: geração de peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), um potente oxidante capaz de causar disfunção vascular (Griendling e Fitzgerald, 2003); e perda da bioatividade do NO, com conseqüente redução da capacidade vasodilatadora dependente do endotélio (Rubanyi e Vanhoutte, 1986). A enzima NO sintase (NOS) sintetiza o NO e três isoformas distintas dessa enzima são descritas: NOS neuronal (nNOS ou tipo I), NOS induzível (iNOS ou tipo II) e NOS endotelial (eNOS ou tipo III) (Boucher *et al.*, 1999). É importante ressaltar que a redução da biodisponibilidade de NO no vaso de animais tratados cronicamente com etanol é prevenida pelo losartan, fato que implica o SRAA nessa resposta (Passaglia *et al.*, 2015). Esse conjunto de dados sugere que o estresse oxidativo vascular induzido pelo etanol é mediado pelo SRAA e é responsável pela disfunção vascular associada ao consumo crônico desse composto.

Além de promover efeitos diretos na vasculatura, o SRAA influencia o perfil secretório do PVAT, que é um tecido localizado na região mais externa dos vasos sanguíneos, em contato direto com a túnica adventícia, servindo como estrutura de suporte além de possuir propriedades secretórias (Szasz e Webb, 2012; Boydens *et al.*, 2012; Cheng *et al.*, 2018). Em condições fisiológicas o PVAT promove efeito anti-contrátil uma vez que produz e libera substâncias vasoativas que tem ação vasorelaxante (Soltis e Cassis, 1991; Lohn *et al.*, 2002). Dentre as substâncias vasorelaxantes produzidas pelo PVAT estão o NO, sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), adipocinas (ex. adiponectina, leptina e resistina), prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), metil palmitato (PAME) e a angiotensina (1-7). Em conjunto, essas moléculas medeiam o efeito anti-contrátil do PVAT em diferentes vasos. No entanto, o PVAT também produz fatores vasocontráteis como, por exemplo, a noradrenalina, ERO, interleucina (IL)-6, fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$  e quemerina (Szasz e Webb, 2012; Cheng *et al.*, 2018).

A composição do PVAT é complexa e varia de acordo com o território vascular. Diferentes tipos celulares são encontrados nesse tecido como células do sistema imunológico incluindo células dendríticas, além de linfócitos T, e macrófagos (Wei *et*

*al.*, 2014; Schenkel *et al.*, 2014; Ensan *et al.*, 2016). É importante ressaltar que, em termos de composição, há predomínio dos adipócitos no PVAT. Dependendo do território vascular, o PVAT pode ser composto pela mistura de tecido adiposo marrom (brown adipose tissue – BAT) e tecido adiposo branco (white adipose tissue – WAT), ou composto exclusivamente por WAT, como nas artérias mesentéricas (Gao, 2007). O WAT é composto por uma única vesícula lipídica grande e tem como principal função o armazenamento de lipídeos (ex.: colesterol e triglicerídeos). Esses adipócitos também desempenham função metabólica, pois são responsáveis pela secreção de adipocinas incluindo a resistina, adiponectina e leptina. Dessa forma, o PVAT é considerado como um tipo de tecido adiposo funcionalmente especializado que possui diferentes propriedades de secreção e que por esse motivo, exerce efeito modulatório na função vascular (Cheng *et al.*, 2018; Nosalski e Guzik, 2017).

A ação anti-contrátil do PVAT é evidenciada em condições fisiológicas, mas em situações não fisiológicas como na obesidade, hipertensão arterial e diabetes, há alteração do fenótipo anti-contrátil desse tecido, que passa a produzir citocinas pró-inflamatórias (ex.: IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ) e ERO, respostas que levam à disfunção vascular/endotelial (Watts e Gollasch, 2018). Como mencionado anteriormente, o SRAA influencia o PVAT favorecendo a secreção de agentes pró-contráteis e pró-inflamatórios. Essas ações são mediadas pela ANGII e também pela aldosterona. Essa última, promove uma série de ações que favorecem a mudança do fenótipo anti-contrátil para pró-contrátil. As ações da aldosterona nos adipócitos são mediadas pelos MR (Caprio *et al.*, 2007; Nguyen Dinh Cat *et al.*, 2011), e incluem a produção de citocinas pró-inflamatórias e aumento do estresse oxidativo. Nesse sentido, Guo *et al.* (2008) demonstraram que a eplerenona, um antagonista dos MR reduziu a expressão gênica de IL-6 e TNF- $\alpha$  no tecido adiposo de camundongos obesos diabéticos (Guo *et al.*, 2008). Em artérias mesentéricas de ratos saudáveis, o efeito anticontrátil de PVAT foi perdido após incubação com aldosterona, tendo sido essa resposta revertida pela eplerenona (Withers *et al.*, 2011). Além disso, o bloqueio dos MR reduziu a produção de ERO em adipócitos da linhagem T3-L1 (Hirata *et al.*, 2009, 2012).

Além da indução de proteínas pró-inflamatórias, a aldosterona também altera o balanço redox vascular. Nesse sentido, foi descrito que o tratamento com eplerenona inibiu o aumento da expressão das subunidades p22 e p47phox da NADPH oxidase em tecido adiposo de camundongos obesos ob/ob e db/db (Hirata *et al.*, 2009). Além disso,

o aumento da produção de ERO observado no tecido adiposo de animais obesos também pode ser devido à diminuição da expressão gênica das enzimas catalase e Cu/Zn-SOD, que foram reduzidos nesses animais, mas restaurados pela administração de eplerenona (Hirata *et al.*, 2009). Outros estudos também relataram a regulação positiva de enzimas antioxidantes (SOD e catalase) na vasculatura por bloqueio dos MR (Silva *et al.*, 2015). O aumento da expressão dos MR em adipócitos de camundongo levou ao aumento da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por mecanismo associado à diminuição dos níveis de RNAm da catalase e ao aumento dos níveis de RNAm de Nox4, e essas respostas foram associadas à alterações da contratilidade vascular (Nguyen Dinh Cat A *et al.*, 2016). Camundongos que não expressam o MR em adipócitos (AdipoMR-KO) e que foram alimentados com dieta rica em gordura não apresentaram aumento do estresse oxidativo, redução da defesa antioxidante ou mesmo aumento de marcadores inflamatórios, que são respostas características da obesidade (Hayakawa *et al.*, 2018). Resultados semelhantes foram relatados por Feraco *et al.* (2018). Dessa forma, esses estudos evidenciam a participação dos MR no estresse oxidativo e indução de proteínas inflamatórias em adipócitos.

## **2. HIPOTESE E OBJETIVOS**

Por meio de um processo que envolve alterações vasculares e neuro-humorais, o consumo crônico de etanol induz aumento da pressão arterial, figurando como importante fator de risco no desenvolvimento da hipertensão arterial. O consumo de etanol ativa o SRRRA promovendo o aumento da aldosterona circulante. Esse hormônio atua em receptores MR no vaso e no PVAT gerando alteração no balanço redox e na síntese de citocinas pró-inflamatórias em diferentes condições incluindo diabetes, hipertensão arterial e obesidade. Os receptores MR promovem o aumento do estresse oxidativo e indução de proteínas inflamatórias em adipócitos. Dessa forma, a hipótese do presente estudo é a de os MR participarem das alterações vasculares induzidas pelo consumo de etanol. Em conjunto, essas ações contribuirão para a disfunção vascular e do PVAT e aumento da pressão arterial induzido pelo consumo de etanol. Dessa forma, o presente estudo foi delineado de forma a investigar a participação dos MR nas alterações vasculares e do fenótipo anti-contrátil do PVAT induzidas pelo consumo crônico de etanol. Com esse propósito o canrenoato de potássio, um antagonista dos MR foi empregado como ferramenta farmacológica em animais tratados cronicamente com etanol.

### **3. METODOLOGIA**

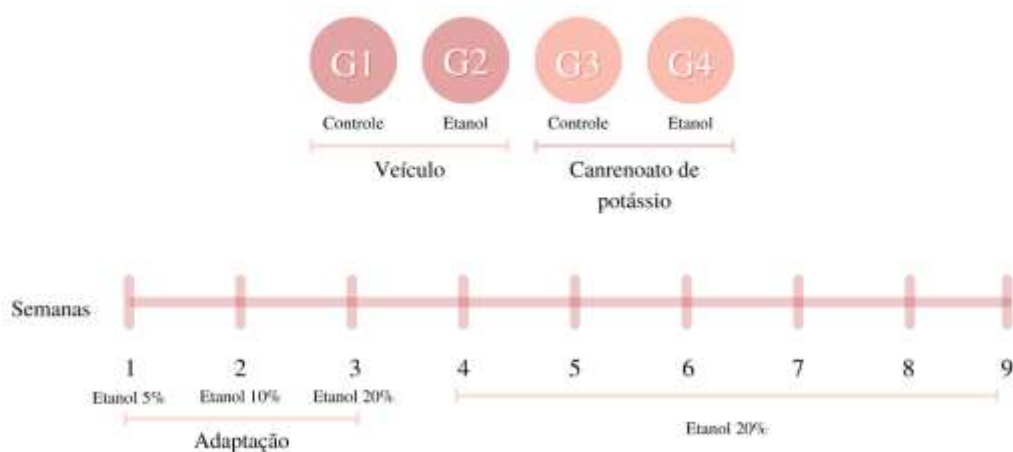
#### **4. 3.1. ANIMAIS**

Foram utilizados ratos Wistar Hannover adultos, com idade média entre 50 e 70 dias (260-280g), provenientes do Biotério Central do Campus da USP de Ribeirão Preto. Durante o tratamento os animais permaneceram no biotério de manutenção da EERP/USP com temperatura controlada por ar condicionado tipo split (22-24°C), ciclo automático claro/escuro de 12 h (luzes acesas às 06:00 h) e livre acesso à água e ração convencional. Os ratos permaneceram em rack ventilada (AL21, Alesco, Brasil) mantidos em grupos de 2 em mini-isoladores de polissulfona com área de 1.612 cm<sup>2</sup>, tendo cama de maravalha trocada 3 vezes por semana. O número amostral foi determinado utilizando o software G\*Power (<http://www.gpower.hhu.de/>). Os protocolos utilizados nesse estudo estão em acordo com as leis do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da EERP/USP (#20.1.402.22.4).

#### **3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS**

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos: 1) Controle: animais tiveram livre acesso a água e receberam solução salina por gavagem (veículo do canrenoato de potássio) no volume de administração de 10 ml/kg; 2) Etanol: animais tiveram livre acesso exclusivamente a uma solução de etanol a 20% (vol./vol.) e receberam solução salina por gavagem; 3) Canrenoato de potássio: animais tiveram livre acesso a água e receberam solução de canrenoato de potássio [sal potássico do ácido carboxílico 17-hidroxi-3-oxopregna-4,6-dieno-21 (#C7287, Sigma Aldrich, St. Louis, IL, EUA)] na dose de 30 mg/kg/dia por gavagem diluído em salina no volume de administração de 10 ml/kg; 4) Etanol + canrenoato de potássio: animais tiveram livre acesso a solução de etanol a 20% (vol./vol.) e receberam solução de canrenoato de potássio (30 mg/kg/dia). Os animais dos grupos tratados com etanol foram condicionados a um período de adaptação de 2 semanas que consistiu no fornecimento de etanol em concentrações crescentes semanais de 5 e 10% (Figura 1). Entre a 3<sup>a</sup> e 5<sup>a</sup> semanas de tratamento os animais tiveram livre acesso a uma solução de etanol 20%. Ao término da 5<sup>a</sup> semana os animais foram anestesiados intraperitonealmente com uretana 1,25g/kg em solução de 25% [5ml/kg] (SigmaAldrich, St. Louis, IL, EUA) e mortos por exsanguinação seguida de rompimento do diafragma. Durante o tratamento,

os animais tiveram o consumo de ração, de líquido e peso corporal avaliados semanalmente. Foram coletados o leito arterial mesentérico, PVAT (que circunda o leito arterial mesentérico) e sangue. Foi realizada avaliação semanal de ganho de peso e consumo de líquido e ração. A participação dos MR nas alterações vasculares induzidas pelo etanol foi avaliada por meio de tratamento diário com canrenoato de potássio (Figura 1). Esse antagonista dos MR (MRA) tem sido usado para avaliar disfunção endotelial/vascular observada em diferentes modelos experimentais (Latouche *et al.*, 2012; Vergaro *et al.*, 2016; Cat *et al.*, 2018; Lefranc *et al.*, 2019). O canrenoato de potássio é amplamente utilizado como ferramenta farmacológica por ser um MRA solúvel em soluções aquosas e apresentar biodisponibilidade oral próxima de 100% (Kolkhof e Barfacker, 2017; Brunton *et al.*, 2019). Na vasculatura, o canrenoato de potássio promove significativa redução da geração de ERO, aumento da biodisponibilidade de NO, aumento da capacidade antioxidante além de restaurar a função endotelial/vascular e promover redução da pressão arterial (Cat *et al.*, 2018; Lefranc *et al.*, 2019).



**Figura 1. Modelo de tratamento com etanol e canrenoato de potássio.** Os animais do grupo etanol passaram por um período de adaptação de 2 semanas que consistiu no fornecimento de etanol em concentrações crescentes de 5 e 10% (vol./vol.). Em seguida os animais tiveram acesso à solução de etanol 20% por 3 semanas (Tirapelli *et al.*, 2006). A participação dos MR nas ações vasculares do etanol foi avaliada com o uso de canrenoato de potássio (30mg/kg/dia) por via oral (gavagem).

### **3.3 DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE**

**ALDOSTERONA:** As concentrações séricas de aldosterona (pg/ml) foram determinadas por *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) usando kit comercial (nº 501090, Cayman, Ann Arbor, MI, EUA). As amostras foram purificadas quatro vezes com clorofórmio, em seguida foram centrifugadas a 3000 xg, 10min, 4°C, para garantir uma melhor separação das camadas e também menor variabilidade no ensaio. As amostras (100µl) foram transferidas para placa de 96 poços, cobertas e encubadas por 18h a 4°C. Após a incubação os poços foram esvaziados e enxaguados cinco vezes com tampão de lavagem utilizando uma pipeta multicanais. Posteriormente foi adicionado 200 µl do reagente de Ellmans em cada poço, em seguida a placa foi coberta e colocada no agitador orbital na ausência de luz por 120 minutos. Posteriormente leitura da placa foi realizada em um comprimento de onda em 415nm.

### **3.4 AVALIAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL:**

A pressão arterial foi avaliada ao término do tratamento. Os ratos foram anestesiados com cetamina/xilazina (80/10mg/kg, i.p.) e uma cânula (um segmento de 4 cm de PE-10 ligado a um segmento de 13 cm de PE-50), (Clay Adams, Parsippany, NJ, EUA) foi inserida na aorta abdominal pela artéria femoral para o monitoramento da pressão arterial diastólica, sistólica e média (PAM). A cânula foi exteriorizada no dorso do animal. Vinte e quatro horas após canulação a pressão arterial e batimentos cardíacos foram registrados por período de 10 min usando um amplificador HP-7754A (Hewlett Packard, EUA) conectado a um computador e processados pelo software Windaqdi 190 (Dataq, EUA). Os resultados foram expressos em mmHg ou batimentos por minuto (BPM).

### **3.5. ESTUDO FUNCIONAL DA REATIVIDADE VASCULAR EM LAM:**

Experimentos funcionais foram conduzidos no segundo ramo de artérias mesentéricas com endotélio intacto na presença ou ausência de PVAT [PVAT (+) e PVAT (-), respectivamente]. Os anéis foram transferidos para um miógrafo (Mulvany–Halpern modelo 610M; Danish Myo Technology, Copenhagen, Dinamarca) e os dados foram obtidos utilizando um PowerLab 8/SP (AD Instruments, Castle Hill, Austrália). Os anéis foram mantidos em temperatura constante de 37 °C e gaseificados com mistura carbogênica (95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>) em solução de Krebs modificado cuja composição é



(em mmol/l): 130 NaCl, 4,7 KCL, 14,9 NaHCO<sub>3</sub>, 1,18 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,17 MgSO<sub>2</sub>.7H<sub>2</sub>O, 5,5 glucose, 1,56 CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O e 0,026 EDTA. As preparações permaneceram em repouso sob tensão de 13 kPa durante 45 min para estabilização. A contração induzida por KCL (60, 90 e 120 mmol/l) foi determinada em preparações com ou sem PVAT. A integridade do endotélio foi testada pelo relaxamento induzido pela acetilcolina (10 µmol/l) sobre contração mantida com fenilefrina (3 µmol/l). Curvas concentração-resposta para fenilefrina (10 nmol/l - 10 µmol/l) foram determinadas nas artérias PVAT (+) e PVAT (-). As curvas concentração-efeito para acetilcolina (10 nmol/l a 10 µmol/l) foram obtidas em artérias mesentéricas PVAT (+) e PVAT (-) pré-contraídas com fenilefrina (3 µmol/l). A partir das curvas concentração-resposta, foram determinados por regressão não linear o valor de pD<sub>2</sub> que consiste no logaritmo negativo da concentração molar do agente vasoativo que promove 50% do efeito máximo (EC<sub>50</sub>), bem como os respectivos efeitos máximos (E<sub>max</sub>) corrigidos pelo comprimento da artéria (mm), que foram expressos em mN//mm para (fenilefrina) ou % de relaxamento (acetilcolina).

### **3.6. AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO (LEITO ARTERIAL MESENTÉRICO E PVAT):**

**3.6.1. Determinação da geração de O<sub>2</sub><sup>•-</sup>:** Os tecidos foram homogeneizados em tampão fosfato pH 7,4 (20 mmol/l de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mmol/l de EGTA e 150mmol/l de sacarose). A reação foi iniciada pela adição do substrato NADPH (0,1 mmol/L) a uma suspensão (com volume final de 250 µl) contendo amostra (50 µl), lucigenina (5 µmol/l) e tampão fosfato pH 7,4. Os valores de luminescência 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 em um luminômetro Orion II (Berthold detection systems, Pforzheim, Alemanha). Em todos os protocolos experimentais, o conteúdo proteico das amostras foi analisado pelo método de Lowry (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA). Os resultados foram normalizados pela concentração proteica de cada amostra e expressos como URL (unidades relativas de luz) /mg de proteína.

**3.6.2. Determinação da concentração de malondialdeído (MDA):** Os tecidos foram homogeneizados e centrifugados (1.600 × g, 10 min, 4°C). Após centrifugação, 100 µl

do sobrenadante foi transferido para tubos de 1,5 ml aos quais foram posteriormente adicionados água Milli-Q® (100 µl), dodecil sulfato de sódio (SDS) 8,1% (100 µl), tampão ácido acético pH 3,5 (350 µl) e ácido tiobarbitúrico 0,6% (350 µl). Uma curva padrão de malondialdeído (MDA) foi preparada a partir de volumes crescentes de MDA (0,03 mol) sendo as concentrações finais de 22,5, 15, 7,5, 3,75 e 0 nmol/l. Em seguida as amostras foram deixadas em banho de aquecimento (95°C, 1 h) e centrifugadas (1.600 × g, 10 min, 4°C). O sobrenadante (150 µl) foi transferido para uma placa de 96 poços e a concentração de MDA foi determinada colorimetricamente (532 nm) utilizando a curva para MDA como referência. Os resultados foram expressos em mmol/ml.

**3.6.3. Avaliação da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** A concentração tecidual de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi avaliada por fluorimetria (λ excitação 571, λ emissão 585 nm) em homogenatos seguindo as especificações do fabricante do kit Amplex® Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit (#A22188, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Os tecidos foram homogeneizados em solução de Krebs (mmol/l): NaCl 130; KCl 4,7; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,18; MgSO<sub>4</sub> 1,17; NaHCO<sub>3</sub> 14,9; Glicose 5,5; CaCl<sub>2</sub> 1,6; pH 7,4). O homogenato obtido foi centrifugado (10.000 × g, 4°C, 5 min). Para a montagem da placa, a cada 50 µl do sobrenadante obtido foi adicionado 50 µl de solução composta pelo reagente Amplex® Red (10-acetil-3,7-diidroxifenoxazine). Uma curva padrão de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi construída e os valores de concentração obtidos nas amostras foram expressos em nmol/l/mg proteína.

**3.6.4. Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD):** Os tecidos foram homogeneizados em PBS pH 7,4, sendo o homogenato centrifugado a 4.000 x g, 4°C por 12 min. Em seguida, 20 µl de sobrenadante foram adicionados a placa para iniciar a reação com o tetrazólio (solução de trabalho) (#19160, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Quanto menor a atividade da SOD, maior a concentração de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> na amostra, que por sua vez reagiu com o tetrazólio levando a formação do formazam, que possui coloração amarela. Os resultados foram expressos em % de inibição, ou seja, a capacidade da SOD em inibir a reação do O<sub>2</sub><sup>•-</sup> com o tetrazólio.

**3.6.5. Determinação da atividade da catalase:** Os tecidos foram homogeneizados em 200µl de tampão fosfato (HPO<sub>4</sub> 0,1 mol/l+ triton X-100, pH 7,4). As amostras

foram centrifugadas (5.000 x g, 10 min, 4°C). Em seguida, uma curva padrão de catalase foi preparada (160 U/ml), sendo as concentrações finais de 0, 5, 10, 20, 40, 60 e 80 U/ml. Em microtubos de 1,5 ml foi adicionado 30 µl de homogenato e 500 µl do substrato (O<sub>2</sub>, 2,5mmol/l). Após 1 min foi adicionado aos microtubos 500 µl de solução stop (azida sódica 10mmol/l) e homogeneizados por inversão. Em seguida 20 µl foram pipetados em uma microplaca e posteriormente 180 µl do cromógeno (reagente de FOX-2). Após 30 min de incubação em temperatura ambiente foi realizada a leitura em comprimento de onda de 560 nm no espectrofotômetro. A atividade da catalase foi expressa em U/mg de proteína.

**3.6.6. Determinação da concentração da glutathiona (GSH) reduzida:** Os tecidos foram homogeneizados em 300 µl de PBS (68,9 mmol/l de NaCl, 4,08 mmol/l de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,73 mmol/l de KHPO<sub>4</sub> e 1,34 mmol/l de KCl pH 7,4). Ácido tricloroacético 12,5% (1v/1v) foi adicionado aos homogenatos que permaneceram 30 min em gelo. As amostras foram centrifugadas (10.000 × g. 15 min, 4 ° C) e 80 µl de sobrenadantes foram analisados espectrofotometricamente a 415 nm. A concentração de GSH reduzida foi determinada com base em sua interação com 5,5'-ditiobis- (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) que forma o produto amarelo 5'-tio-2-nitrobenzóico (TNB). Os resultados foram expressos como µg/mg de proteína.

### **3.7. AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ADIPOCINAS NO PVAT:**

**3.7.1. Determinação das concentrações de adiponectina no PVAT:** As amostras de PVAT foram coletadas, centrifugadas (6.500 x g, 10min, 4°C) e posteriormente diluídas 1000 vezes (10µl de amostra mais 450 µl tampão de diluição). A concentração tecidual de adiponectina foi determinada por ELISA (MRP300, R&D systems, Minneapolis, Min, USA). As amostras (50 µl) e o padrão foram transferidos para uma placa de 96 poços que em seguida foi coberta e incubada a temperatura ambiente no agitador. Após a incubação por 60 min, a solução contida nos poços foi descartada e os poços foram lavados manualmente por 4 vezes com 400µl de tampão de lavagem utilizando uma pipeta multicanais. Posteriormente, o conjugado de adiponectina (100µl) foi adicionado aos poços e a placa foi coberta novamente. Após 60 min, o conteúdo foi descartado e a placa foi lavada novamente conforme descrito anteriormente. Em seguida, foi adicionado substrato (100µl) aos poços e a placa foi coberta por 30 min no escuro. Após

esse período o conteúdo dos poços foi descartado e os poços foram lavados como descrito anteriormente. Por fim foi adicionado o volume de 100µl da solução de parada nos poços e a placa foi lida (450 nm). Os resultados foram expressos em ng/mg de proteína.

**3.7.2. Determinação das concentrações de leptina no PVAT:** As amostras de PVAT foram coletadas, centrifugadas (6.500 x g, 10min, 4°C) e posteriormente diluídas 20 vezes (14µl de amostra mais 266 µl tampão de diluição). A concentração tecidual de leptina foi determinada por ELISA (A05176.96, Bertin Pharma, Montigny-Bretonneux, França). As amostras (100 µl) e o padrão foram transferidos para uma placa de 96 poços que em seguida foi coberta e incubada a temperatura ambiente no agitador. Após a incubação por 60 min, a solução contida nos poços foi descartada e os poços foram lavados manualmente por 3 vezes com 300µl de tampão de lavagem utilizando uma pipeta multicanais. Posteriormente, o anticorpo marcado com biotina (100µl) foi adicionado aos poços e a placa foi coberta novamente. Após 60 min, o conteúdo foi descartado e a placa foi lavada novamente conforme descrito anteriormente. Em seguida, foi adicionado estreptavidina HRP tracer (100µl) aos poços e a placa foi coberta por 30 min no escuro. Após esse período o conteúdo dos poços foi descartado e os poços foram lavados como descrito anteriormente. Em seguida, foi adicionado substrato (100µl) aos poços e a placa foi coberta por 10 min no escuro. Por fim foi adicionado o volume de 100µl da solução de parada nos poços e a placa foi lida (450 nm). Os resultados foram expressos em ng/mg de proteína.

### **3.8. AVALIAÇÃO DE MEDIADORES PRÓ-INFLAMATÓRIOS VASCULARES, E INFILTRAÇÃO DE NEUTROFILOS E MACROFAGOS:**

**3.8.1. Determinação das concentrações teciduais de TNF- $\alpha$ :** Os tecidos foram homogeneizados e posteriormente centrifugados (6.500 × g, 10 min, 4°C). As concentrações de TNF- $\alpha$  (pg/mg de proteína) foram determinadas por enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) usando kit comercial (RAB0480, Sigma-Aldrich, St. Louis, IL, EUA). As amostras (100 µl) e o padrão foram transferidos para placa de 96 poços que foi em seguida coberta. Após incubação por 150 min a solução contida nos poços foi descartada e cada poço foi lavado manualmente por 4 vezes com 300 µl de tampão de lavagem utilizando uma pipeta multicanais. Posteriormente, o anticorpo (100

μl) foi adicionado aos poços e a placa foi coberta. Após 1 h, o conteúdo foi descartado e a placa foi novamente lavada como descrito anteriormente. Em seguida, solução de estreptavidina (100 μl) foi adicionada aos poços e a placa foi coberta por 45 min. Após esse período, o conteúdo foi descartado e os poços foram lavados como descrito anteriormente. Posteriormente, foi adicionado volume de 100 μl do tampão colorimétrico tetrametilbenzidina (TMB) e a placa foi incubada por 30 min no escuro. Por fim, foi adicionado 50 μl da solução de parada e a placa foi lida (450 nm). Todos os passos foram realizados em temperatura ambiente.

**3.8.2. Determinação da atividade de mieloperoxidase (MPO):** A quantificação do acúmulo de neutrófilos foi avaliada pela determinação da atividade da enzima MPO. As amostras (100 mg) foram homogeneizadas em tampão EDTA-fosfato de sódio (NaCl 0,1 mol/l; NaPO<sub>4</sub> 0,02 mol/l; Na<sub>2</sub>EDTA 0,015 mol/l, pH 4,7), agitadas vigorosamente, e centrifugadas a 9.600 x g por 10 min e 4°C. O sedimento foi ressuspenso em solução de lise hipotônica (NaCl 0,2% e NaCl 1,6% com glicose 5%) e centrifugado novamente. O sobrenadante foi descartado e o sedimento solubilizado em tampão fosfato de sódio 0,05 mol/l (pH 5,4), contendo 0,5% brometo de hexa-1,6-bis-deciltrimetilamônio (HTAB, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), detergente iônico importante para a solubilização da MPO, facilitando sua extração. As amostras passaram por três ciclos de congelamento-descongelamento em nitrogênio líquido. Posteriormente, as suspensões foram centrifugadas (9.600 × g, 15 min, 4°C) e o sobrenadante utilizado para a medida da atividade da MPO. O ensaio foi realizado pela adição de 25 μl das amostras a 25 μl de substrato 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB 1,6 mmol/l, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), que foram incubados a 37°C por 5 min. Em seguida, 25 μl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,002% foram adicionados à placa, e novamente incubada a 37°C por 5 min. A reação foi paralisada pela adição de 25 μl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4 mol/l. A leitura foi realizada em comprimento de onda de 450nm em espectrofotômetro. A atividade da MPO foi expressa como unidades relativas D.O./mg de proteína.

**3.8.3. Determinação da atividade n-acetilglicosaminidase (NAG):** A quantificação do acúmulo/ativação de macrófagos teciduais foi avaliada pela determinação da atividade da enzima NAG. As amostras (100 mg) foram homogeneizadas em tampão

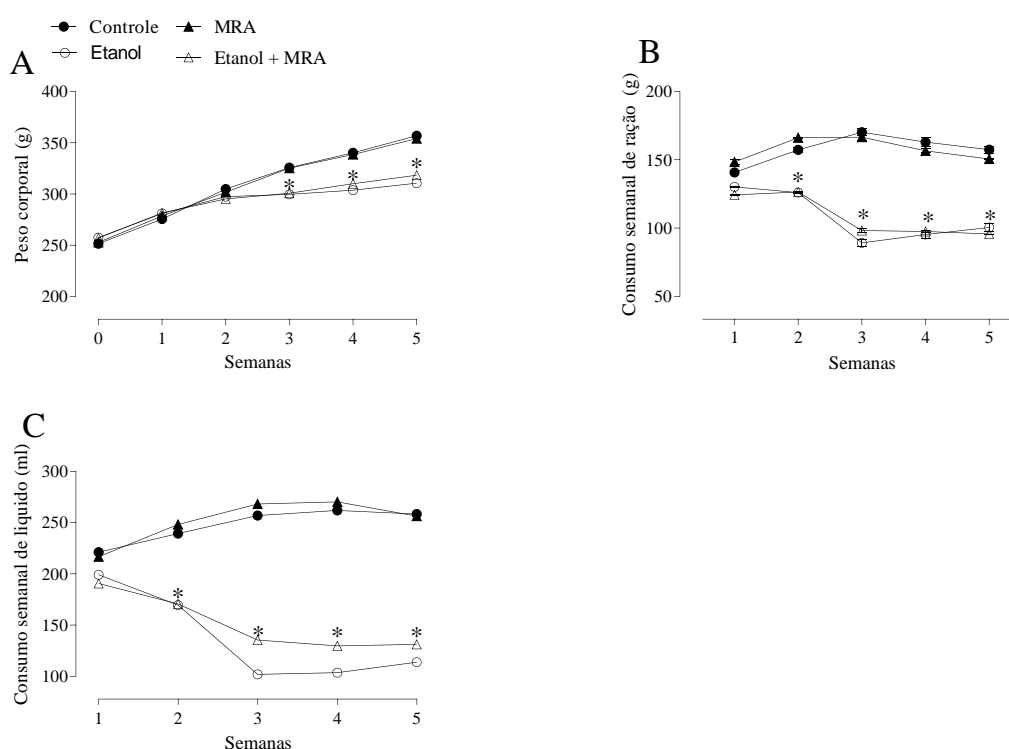
EDTA-fosfato de sódio (NaCl 0,1 mol/l; NaPO<sub>4</sub> 0,02 mol/l; Na<sub>2</sub> EDTA 0,015 mol/l, pH 4,7), agitadas vigorosamente, e centrifugadas a 9.600 x g por 10 minutos a 4°C. O sedimento foi ressuspensionado em solução de lise hipotônica (NaCl 0,2% e NaCl 1,6% com glicose 5%) e centrifugado novamente. O sobrenadante foi descartado e o sedimento solubilizado em salina triton 0,1%. Posteriormente, as suspensões foram centrifugadas a 3000 rpm por 15 min a 4°C e o sobrenadante foi utilizado para a medida da atividade da NAG. O ensaio foi realizado pela adição de 100 µl das amostras a 100 µl de substrato 4-nitrofenil N-acetil-β-D-glicosaminida (#N9376, Sigma-Aldrich, St. Louis, IL, EUA), que foram incubados a 37°C por 10 min. Em seguida, 100 µl de tampão glicina 0,2 mol/l foi adicionado à placa. A leitura foi realizada em comprimento de onda de 405 nm em espectrofotômetro. A atividade da NAG foi expressa como unidades relativas D.O./mg de proteína.

**3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA:** Os resultados foram apresentados como a média ± erro padrão da média (EPM). Análise de variância de duas vias (*two-way* ANOVA), seguida pelo pós-teste de Bonferroni foi realizada para detectar as diferenças entre os valores em estudo. P<0,05 foi considerado significativo

## 4. RESULTADOS

### 4.1. AVALIAÇÃO DO PESO CORPORAL E DO CONSUMO DE RAÇÃO E LÍQUIDO.

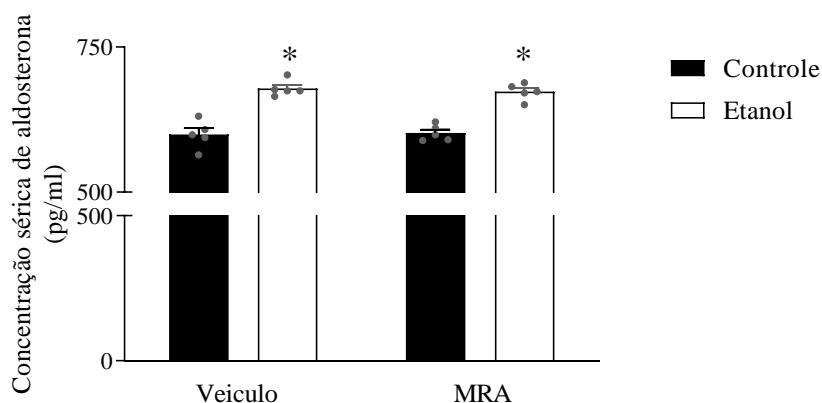
A partir da terceira semana de tratamento os animais dos grupos que consumiram etanol tiveram um menor ganho de peso em comparação aos animais que consumiram água (Figura 2A). Os animais dos grupos tratados com etanol consumiram menos líquido e ração em comparação aos que receberam água (Figuras 2B e C).



**Figura 2. Efeito do tratamento com etanol no peso corporal dos animais e no consumo de ração e líquido.** O peso dos animais foi avaliado semanalmente (A). O consumo semanal de ração (B) e líquido (C, água ou solução de etanol) foi estimado nos animais dos 4 grupos experimentais por meio da média dos valores para cada animal do mini-isolador. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM de  $n=15-16$  animais por grupo. \* vs. os grupos controle e MRA ( $p < 0,05$ , *two-way* ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni).

### 4.2. DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES CIRCULANTES DE ALDOSTERONA

O etanol aumentou as concentrações séricas de aldosterona e tratamento com carenoato de potássio não preveniu esse aumento (Figura 3).

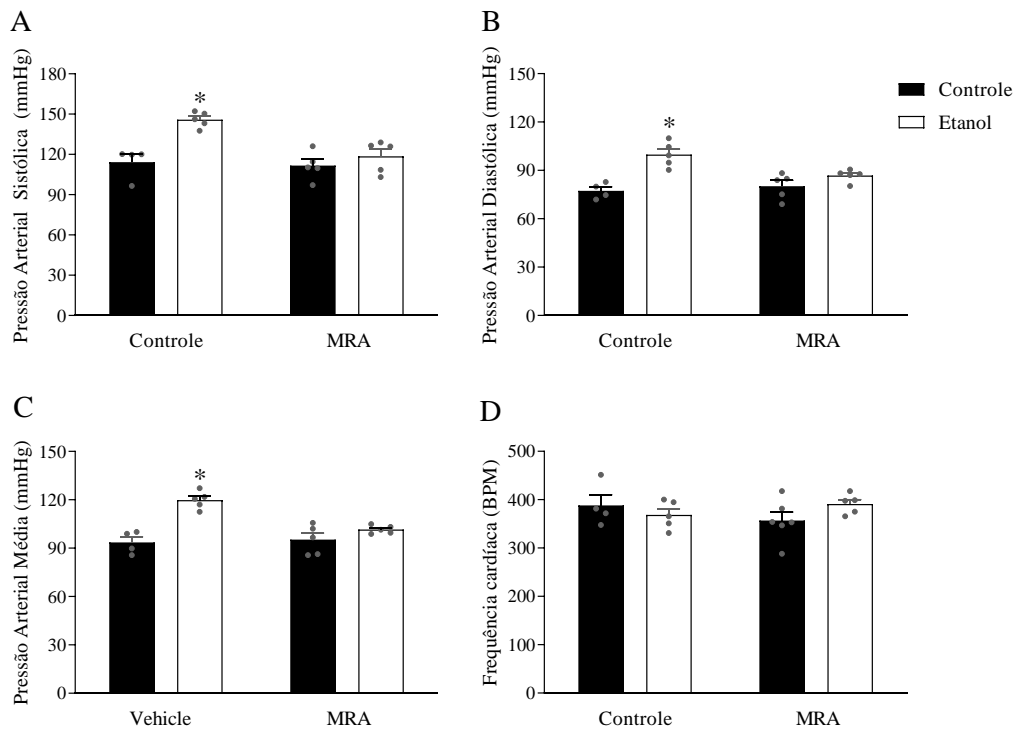


**Figura 3. Efeito do etanol nas concentrações circulantes de aldosterona.** Os resultados são dados como média  $\pm$  S.E.M. de 5 animais. \* vs. os grupos controle e MRA ( $p < 0,05$ , *two-way* ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni).

#### **4.3. AVALIAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA, PRESSÃO SISTÓLICA, PRESSÃO DIASTÓLICA E FREQUÊNCIA CARDÍACA.**

O tratamento com etanol induziu aumento da pressão arterial média (Figura 4A), sistólica e diastólica (Figuras 4B e C), e tratamento com canrenoato de potássio preveniu essas respostas. Não houve diferença nos valores de frequência cardíaca entre os grupos (Figura 4D).



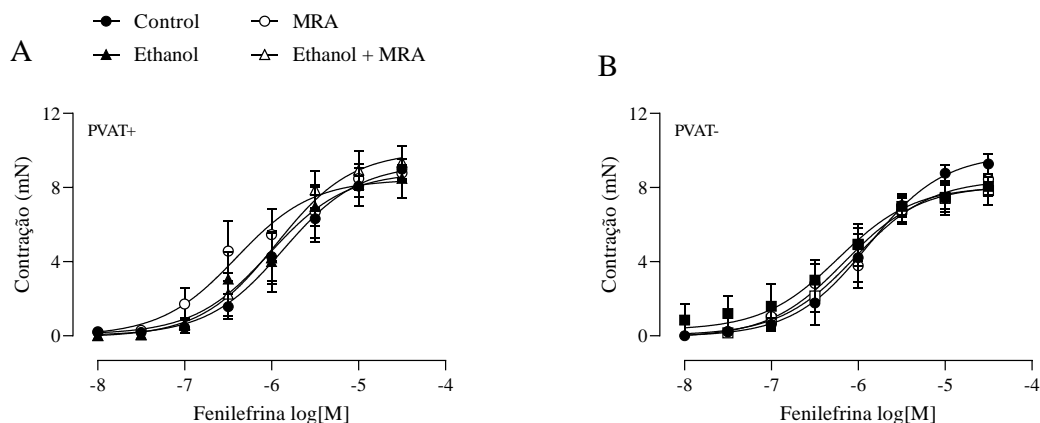


**Figura 4. Efeito do consumo crônico de etanol na pressão arterial média, sistólica, diastólica e na frequência cardíaca.** Os resultados são dados como média  $\pm$  S.E.M. de 4 a 6 animais. \* vs. os grupos controle, MRA e etanol + MRA. ( $p < 0,05$ , *two-way* ANOVA seguida por Bonferroni).

#### 4.4. ESTUDO FUNCIONAL DA REATIVIDADE VASCULAR EM LAM NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DO PVAT

##### 4.4.1. Efeito do consumo de etanol sobre a contração induzida por fenilefrina.

Não houve diferença na contração induzida por fenilefrina entre os grupos tratados com etanol e tratado com MRA na presença ou ausência de PVAT (Figuras 5A e 5B).



**Figura 5. Efeito do consumo crônico de etanol na resposta contrátil induzida por fenilefrina no segundo ramo da artéria mesentérica ratos.** Curvas concentração-resposta para fenilefrina foram determinadas na presença ou ausência de PVAT [PVAT (+) e PVAT (-), respectivamente] do segundo ramo da artéria mesentérica e ratos do grupo controle, etanol, MRA, MRA + etanol. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM de  $n=6-8$  animais por grupo.

Na tabela 1 estão representados os valores de  $E_{max}$  e  $pD_2$  para a contração induzida pela fenilefrina em artérias PVAT (-) e PVAT (+). Não houve diferença nos valores de  $E_{max}$  e  $pD_2$  entre os quatro grupos experimentais.

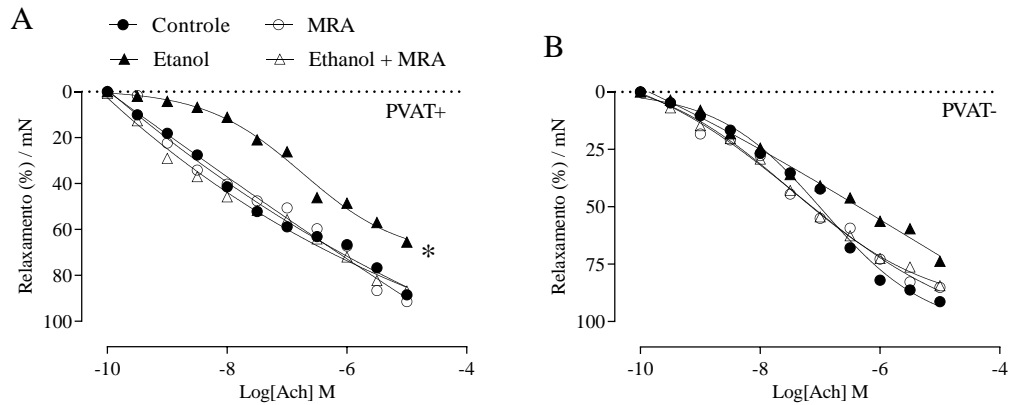
**Tabela 1:** Valores de  $E_{max}$  (mN) e  $pD_2$  para fenilefrina no segundo ramo da artéria mesentérica com PVAT (-) e PVAT (+).

Grupos	PVAT(+)		PVAT(-)	
	$E_{max}$	$pD_2$	$E_{max}$	$pD_2$
Controle	$9,2 \pm 3,1$ (6)	$5,8 \pm 0,1$	$9,7 \pm 0,5$ (8)	$5,8 \pm 0,1$
Etanol	$8,8 \pm 3,3$ (7)	$6,0 \pm 0,1$	$8,0 \pm 0,5$ (8)	$6,2 \pm 0,1$
MRA	$8,4 \pm 5,2$ (7)	$6,4 \pm 0,1$	$8,4 \pm 0,5$ (8)	$6,0 \pm 0,1$
Etanol + MRA	$9,9 \pm 3,9$ (7)	$5,9 \pm 0,1$	$8,0 \pm 0,3$ (8)	$6,1 \pm 0,1$

Os valores representam a média  $\pm$  EPM dos diferentes grupos experimentais. Os números entre parênteses representam o n de cada grupo experimental.

#### 4.4.2. Efeito do consumo de etanol sobre o relaxamento vascular induzido pela acetilcolina

O tratamento com etanol prejudicou o relaxamento induzido pela acetilcolina na presença do PVAT (Figura 6A). Não houve diferença entre os grupos na ausência de PVAT (Figura 6B).



**Figura 5. Efeito do consumo crônico de etanol na resposta ao relaxamento induzida por acetilcolina no segundo ramo da artéria mesentérica ratos.** Curvas concentração-resposta para acetilcolina foram determinadas na presença ou ausência de PVAT [PVAT (+) e PVAT (-), respectivamente] do segundo ramo da artéria mesentérica e ratos do grupo controle, etanol, MRA, MRA + etanol. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM de  $n=5-7$  animais por grupo. \* Comparado aos grupos controle, MRA e etanol + MRA. (*two-way* ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni).

**Tabela 2: Valores de  $E_{max}$  (mN) e  $pD_2$  para a acetilcolina no segundo ramo da artéria mesentérica com PVAT (-) e PVAT (+).**

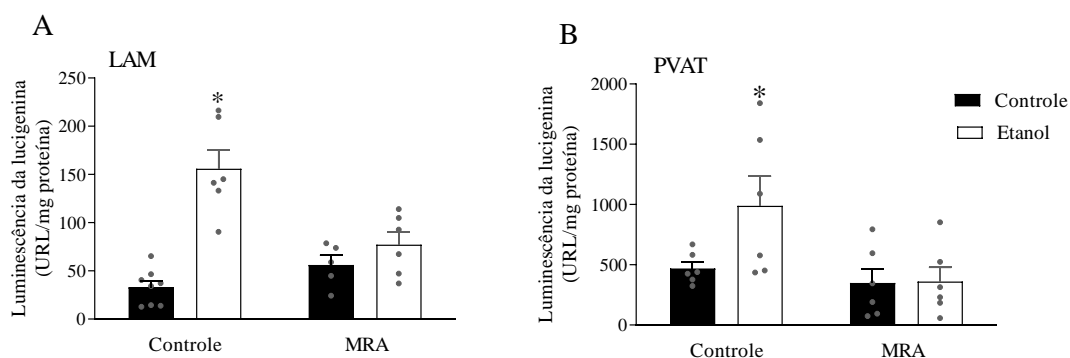
Grupos	PVAT(+)		PVAT(-)	
	$E_{max}$	$pD_2$	$E_{max}$	$pD_2$
Controle	$88,5 \pm 2,4$ (6)	$7,9 \pm 0,2$	$91,3 \pm 3,0$ (6)	$7,0 \pm 0,1$
Etanol	$65,5 \pm 8,2^a$ (4)	$7,7 \pm 0,3$	$73,7 \pm 4,3$ (6)	$7,4 \pm 0,2$
MRA	$91,4 \pm 2,9$ (5)	$6,9 \pm 0,2$	$85,1 \pm 5,4$ (7)	$7,5 \pm 0,1$
Etanol + MRA	$86,8 \pm 5,1$ (5)	$8,1 \pm 0,2^b$	$84,9 \pm 3,8$ (7)	$7,4 \pm 0,1$

Os valores representam a média  $\pm$  EPM dos diferentes grupos experimentais. Os números entre parênteses representam o  $n$  de cada grupo experimental; <sup>a</sup> Comparado aos grupos controle, MRA e etanol + MRA; <sup>b</sup> Comparado aos grupos controle, etanol e MRA. (*two-way* ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni).

## 4.5. AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO VASCULAR

### 4.5.1. Determinação da geração de $O_2^{\cdot-}$ no leito arterial mesentérico e PVAT.

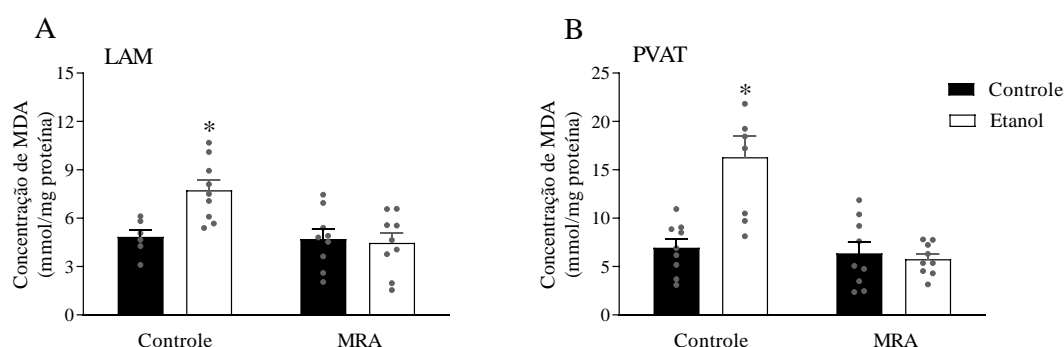
O consumo de etanol aumentou a quimiluminescência da lucigenina no LAM e no PVAT. Essas respostas foram prevenidas pelo tratamento com o canrenoato de potássio (Figuras 7A e B).



**Figura 7. Efeito do consumo de etanol na geração de  $O_2^{\bullet-}$ :** A geração de  $O_2^{\bullet-}$  no leito arterial mesentérico (A) e PVAT (B) foi avaliada pelo ensaio de quimioluminescência derivada da lucigenina. Os resultados são dados como média  $\pm$  EPM de 5 a 8 animais. \*vs. os grupos controle, MRA e etanol + MRA. ( $p < 0,05$ , *two-way* ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni).

#### 4.5.2. Determinação da concentração de MDA no leito arterial mesentérico e PVAT.

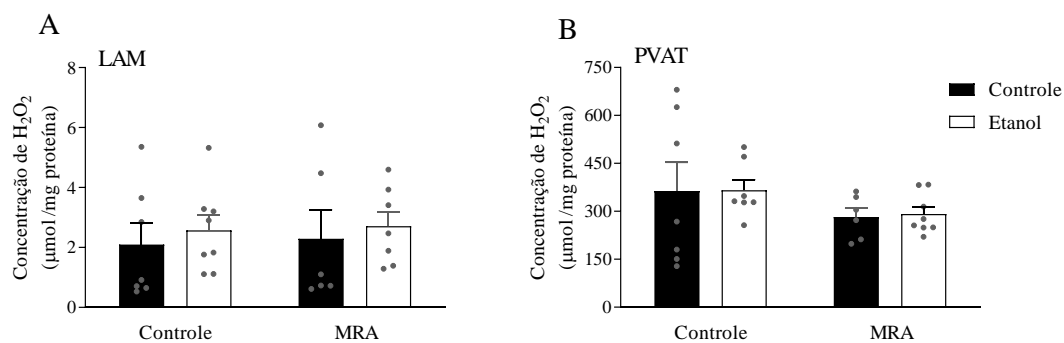
O etanol aumentou a concentração de MDA no LAM e PVAT e o tratamento com antagonista MR preveniu essas respostas (Figuras 8A e B).



**Figura 8. Efeito do consumo de etanol na concentração tecidual de MDA.** A concentração de MDA-no leito arterial mesentérico (A) e PVAT (B) foi avaliada colorimetricamente. Os resultados são dados como média  $\pm$  EPM de 6 a 9 animais. \*vs. os grupos controle, MRA e etanol + MRA. ( $p < 0,05$ , *two-way* ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni).

#### 4.5.3. Avaliação da concentração de $H_2O_2$ no MAB e PVAT.

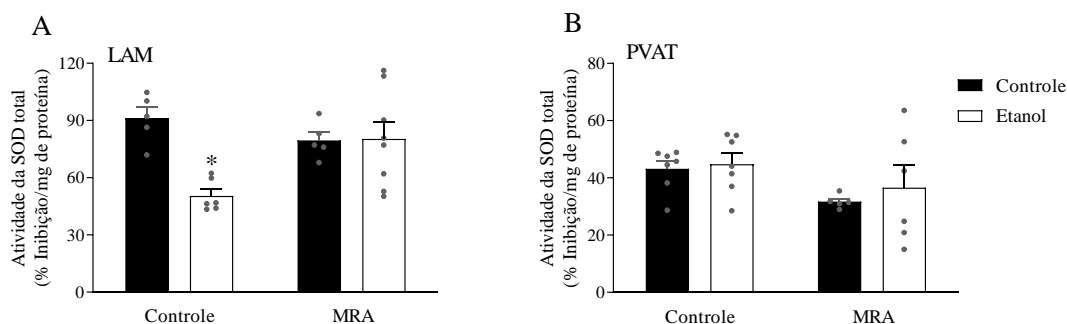
Não houve diferença significativa nas concentrações de  $H_2O_2$  entre os grupos (Fig. 9A e B).



**Figura 9. Efeito do consumo de etanol sobre a concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** As concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (9A e B) foram determinadas por fluorimetria. Os resultados são dados como média ± EPM de 5 a 8 animais.

#### 4.5.4. Determinação da atividade da SOD no leito arterial mesentérico e PVAT.

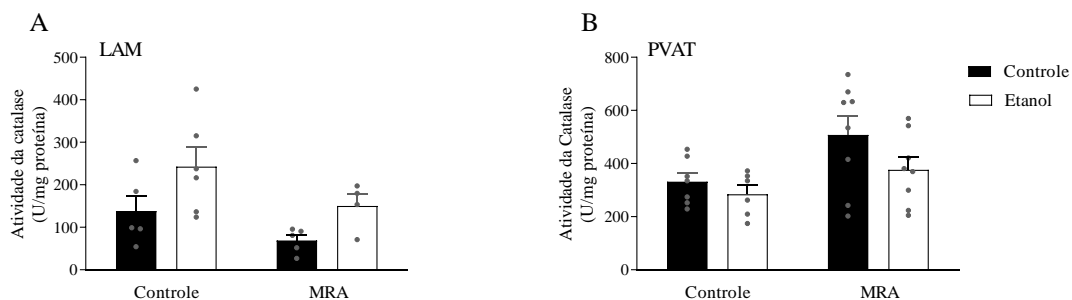
O etanol diminuiu a atividade da SOD no leito arterial mesentérico tendo esse efeito sido prevenido pelo antagonista MR. No entanto, não houve diferença da atividade da SOD no PVAT após tratamento com etanol (Figuras 10A e B).



**Figura 10. Efeito do consumo de etanol na atividade da SOD.** A atividade da SOD no leito arterial mesentérico (A) e PVAT (B) foi avaliada colorimetricamente. Os resultados são dados como média ± EPM de 5 a 8 animais. \*Comparado ao grupo controle, MRA e etanol + MRA. ( $p < 0,05$ , *two-way* ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni).

#### 4.5.5. Determinação da atividade da catalase no leito arterial mesentérico e PVAT.

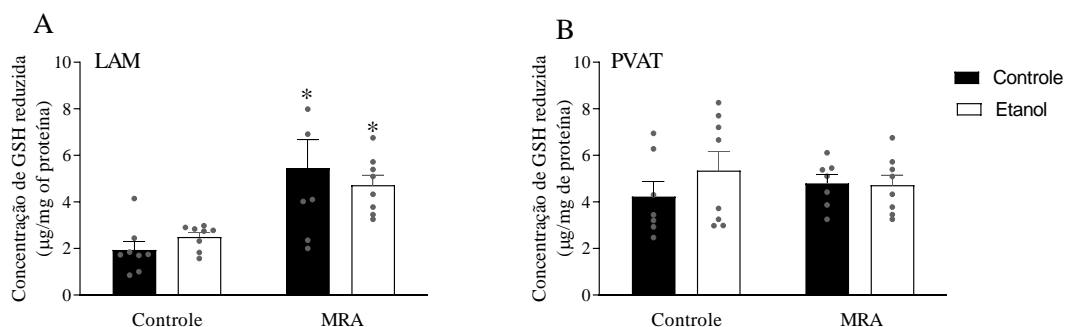
Não houve diferença na atividade da catalase no leito arterial mesentérico e no PVAT após o tratamento com etanol (Figuras 11A e B).



**Figura 11. Efeito do consumo de etanol na atividade da catalase.** A atividade da catalase no leito arterial mesentérico (A) e PVAT (B) foi avaliada colorimetricamente. Os resultados são dados como média  $\pm$  EPM de 6 a 8 animais. (*two-way* ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni).

#### 4.5.6. Avaliação da concentração de GSH no leito arterial mesentérico e no PVAT

O etanol diminuiu a concentração da GSH reduzida no LAM (tendo esse efeito sido prevenido pelo antagonista MR (Figura 12A)). O tratamento com canrenoato não alterou as concentrações da GSH reduzida no PVAT (Figura 12B)).

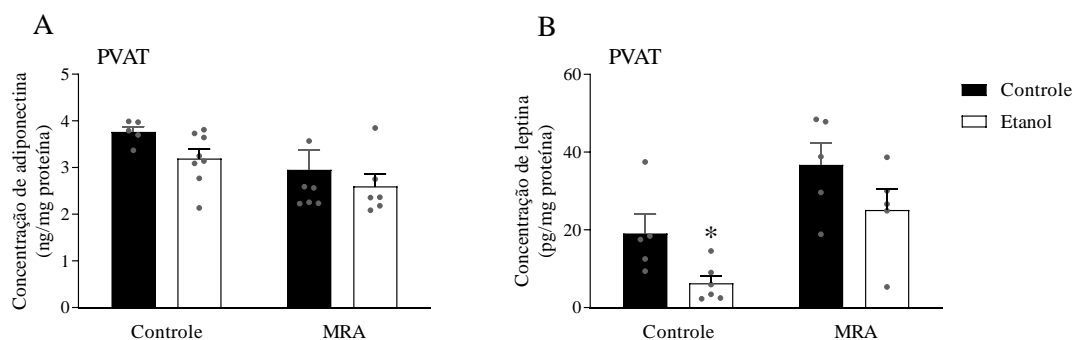


**Figura 12. Efeito do consumo de etanol na concentração de GSH reduzida.** A concentração de GSH reduzida foi determinada colorimetricamente. Os resultados são dados como média  $\pm$  E.P.M. e 7 a 8 animais. \*Comparado ao grupo controle, MRA e etanol + MRA. ( $p < 0,05$ , *two-way* ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni).

#### 4.6. AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ADIPOCINAS NO PVAT

##### 4.6.1. Avaliação da concentração de adiponectina e leptina no PVAT

Não houve diferença significativa nas concentrações de adiponectina entre os grupos (Figura 13A). Consumo de etanol reduziu as concentrações de leptina e o bloqueio dos MR preveniu essa resposta (Figura 13B)).

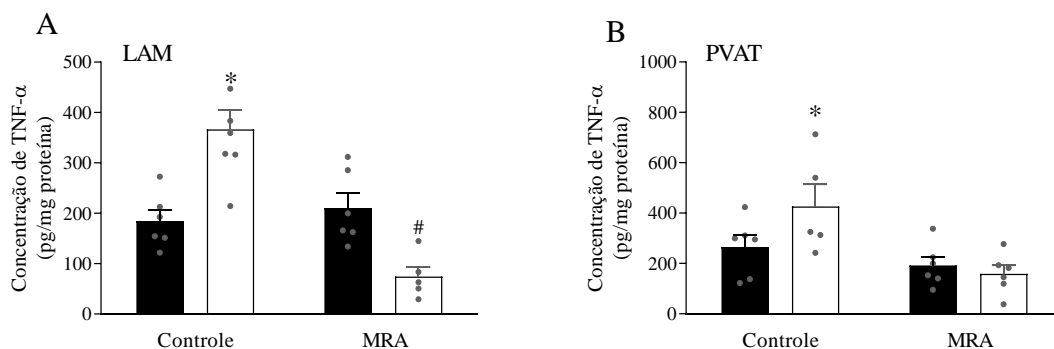


**Figura 13. Efeito do consumo de etanol sobre a concentração de adiponectina e leptina no PVAT.** As concentrações de adiponectina (A) e leptina (B) foram determinadas por ELISA. Os resultados são dados como média  $\pm$  EPM de 5 a 8 animais. \* vs controle, etanol, etanol + MRA. ( $p < 0,05$ , *two-way* ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni).

#### 4.7. AVALIAÇÃO DE MEDIADORES PRÓ-INFLAMATÓRIOS VASCULARES, E INFILTRAÇÃO DE NEUTROFILOS E MACROFAGOS

##### 4.7.1. Determinação das concentrações teciduais de TNF- $\alpha$ no leito arterial mesentérico e PVAT.

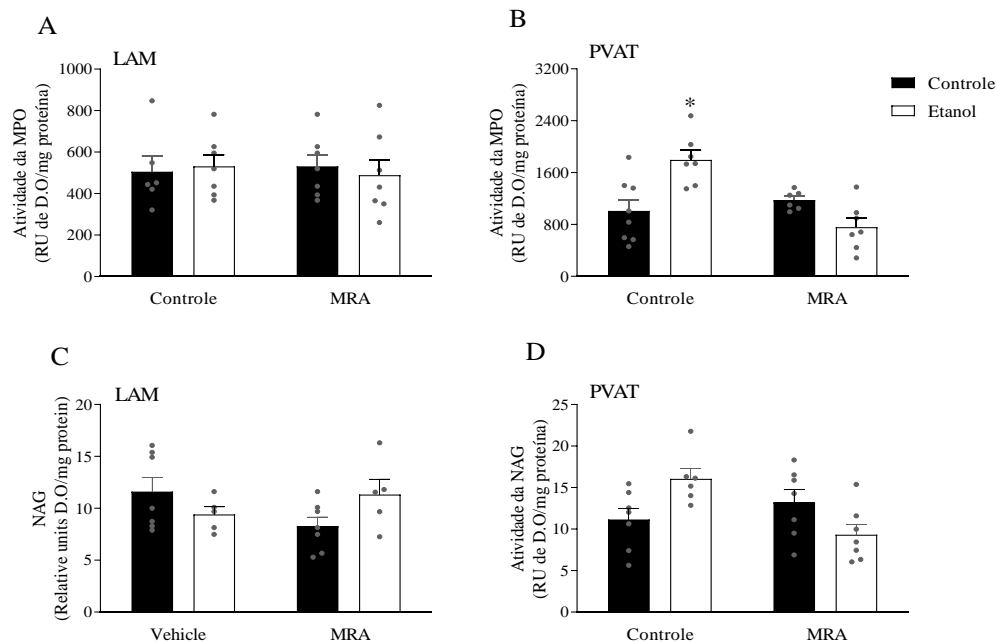
O etanol aumentou os níveis de TNF- $\alpha$  no leito arterial mesentérico e no PVAT e o tratamento com canrenoato de potássio preveniu esse aumento (Figuras 14A e B).



**Figura 14. Efeito do consumo de etanol nas concentrações teciduais de TNF- $\alpha$**  A concentração de TNF -  $\alpha$  no leito arterial mesentérico (A) e PVAT (B) foi determinada por ELISA. Os resultados são dados como média  $\pm$  EPM de 5 a 7 animais. \*Comparado aos grupos controle, MRA e etanol + MRA. #Comparado entre o grupo controle e MRA. ( $p < 0,05$ , *two-way* ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni).

##### 4.7.2. Avaliação da atividade da Avaliação da atividade da MPO e NAG no LAM e PVAT.

Não houve diferença na atividade da MPO no LAM (Figura 15A). O tratamento com etanol promoveu aumento da atividade da MPO no PVAT, e tratamento com MRA preveniu esse efeito (Figura 15B). Não houve alteração na atividade da NAG no LAM e no PVAT (Figuras 15C e D).



**Figura 15. Efeito do consumo de etanol na atividade da MPO e NAG.** As atividades das enzimas foram determinadas colorimetricamente como estimativa da presença tecidual de neutrófilos (MPO) e macrófagos (NAG). Os resultados mostraram a média  $\pm$  SEM de  $n = 5-8$  animais por grupo. \*vs ao grupo controle, MRA e etanol + MRA. ( $p < 0,05$  *two-way* ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni).



## 5. DISCUSSÃO

O etanol ao ser oxidado pela enzima álcool desidrogenase fornece um componente calórico de 7,1 Kcal/g de energia, capaz alterar o estado nutricional, além de alterar vias metabólicas, incluindo a oxidação lipídica, provocando desequilíbrio na produção de gorduras (Lands 1993; Suter *et al.*, 1997; Suter, 2005). Portanto, uma vez que gera energia celular, o etanol interfere no consumo de outras fontes de energia podendo assim reduzir o consumo de ração (Yeomans, 2004). Em nosso estudo, animais tratados com etanol apresentaram menor consumo de ração, líquido (solução de etanol) a partir da segunda semana de tratamento e redução de ganho de peso a partir da terceira semana de tratamento. Resultados semelhantes foram descritos em estudos prévios nos quais os animais tiveram como única fonte de líquido disponível uma solução de etanol (Laure-Aachagiotis *et al.*, 1990; Aguiar *et al.*, 2004; Tirapelli *et al.*, 2006ab, 2008; Do Vale *et al.*, 2021). Dessa forma, a perda de peso desencadeada pelo etanol pode estar ligada redução no consumo médio de ração e na ingestão de líquido.

A ativação do SRAA desempenha um papel fundamental no desenvolvimento e na fisiopatologia de doenças do sistema cardiovascular (Silva *et al* 2019). Os MR são receptores nucleares, funcionando como principais efetores das ações de hormônios esteroides, como por exemplo a aldosterona e o cortisol (Monnens *et al.* 2004; Rosa *et al* 2007). A aldosterona, é secretada em condições nas quais ocorre redução dos níveis plasmáticos de Na<sup>+</sup> ou aumento na ativação do SRAA (Laragh *et al.*, 1960; Musabayane *et al.*, 1993, 1994). As ações da aldosterona são mediadas principalmente por meio dos MR (Hollenberg *et al.*, 2004; Touyz, 2004; Callera *et al.*, 2011; Briones *et al.*, 2012; Bruder-Nascimento *et al.*, 2014). Nossos resultados mostraram que existe ativação do SRAA uma vez que houve aumento das concentrações circulantes de aldosterona. Resultados semelhantes foram descritos na literatura (Da Silva *et al*, 2013; Do Vale *et al.*, 2018). Estudos prévios mostram que o tratamento com o antagonista dos receptores AT1 previne o aumento da pressão arterial e disfunção vascular, assim como aumento dos níveis séricos de aldosterona induzida pelo etanol (Passaglia *et al.*, 2015; Ceron *et al.*, 2017). Assim, sugerimos que o aumento dos níveis circulantes de aldosterona observado em nosso estudo pode ser decorrente da ativação dos receptores AT1 localizados no córtex da suprarrenal.

Os efeitos nocivos do consumo de etanol são diretamente proporcionais a quantidade ingerida desse composto. Dessa forma, a ingestão em altas doses por tempo prolongado está relacionada a alterações na estrutura e funcionalidade do sistema cardiovascular, como também hipertensão arterial (Klatsky *et al.*, 1977, 1986; Macmahon, 1987; Lazarevic *et al.*, 2000; Mirijello *et al.*, 2017). Estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa utilizando o mesmo modelo de consumo de etanol usado nesse estudo demonstraram concentrações de etanol no sangue dos animais na faixa de 35 a 40 mmol/l (Passaglia *et al.*, 2015; Marchi *et al.*, 2016; Do Vale *et al.*, 2018), sendo que essas concentrações foram associadas ao aumento da pressão arterial e disfunção vascular em ratos (Tirapelli *et al.*, 2008; Passaglia *et al.*, 2015; Do Vale *et al.*, 2021). De fato, nossos resultados mostram que o consumo crônico de etanol provocou aumento na pressão arterial média, sistólica, diastólica e que o tratamento com o MRA preveniu esse efeito, implicando a participação dos MR nessa resposta. Utilizando o mesmo modelo experimental do presente estudo, Passaglia *et al.* (2015) verificaram que, apesar do aumento dos níveis plasmáticos de aldosterona e da pressão arterial, o consumo de etanol não alterou os níveis plasmáticos de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ . Dessa forma alterações no balanço hidroeletrólítico não são responsáveis pelo aumento da pressão arterial em resposta ao etanol.

Um mecanismo miogênico tem sido proposto para explicar a hipertensão arterial induzida pelo etanol. Nesse contexto, o consumo de etanol promoveria hipercontratilidade vascular por aumentar a capacidade contrátil ou reduzir o relaxamento vascular (Pinardi *et al.*, 1992; Hatton *et al.*, 1992; Stewart e Kennedy, 1999; Tirapelli *et al.*, 2006 a ,b). Observamos que tanto na presença quanto na ausência do PVAT não houve alteração da contração de artérias mesentéricas induzida pela fenilefrina. Tal resultado pode ocorrer em virtude do período de tratamento, uma vez que Tirapelli *et al.* (2008) observaram hipercontratilidade vascular a partir da nona semana de tratamento com etanol, enquanto o período utilizado no presente estudo foi de cinco semanas. Entretanto, ao avaliarmos a relaxamento dependente de endotélio na presença e ausência de PVAT, observamos que na artéria mesentérica com PVAT de animais tratados com etanol houve um prejuízo no relaxamento induzido pela acetilcolina, sugerindo que o PVAT está disfuncional. Em condições fisiopatológicas o PVAT passa a expressar um fenótipo pró-inflamatório e pró-contrátil. Nossos resultados mostram que o consumo de etanol figura como um fator que induz disfunção do PVAT

favorecendo um fenótipo pró-contrátil nesse tecido. Ademais, nossos dados evidenciam a participação dos MR nessa resposta. Dessa forma, buscamos entender os mecanismos associados à alteração do fenótipo do PVAT em nosso modelo.

O consumo de etanol induz estresse oxidativo vascular (Marchi *et al.*, 2016; Simplicio *et al.*, 2017). Nosso estudo mostrou aumento da quimiluminescência da lucigenina tanto no leito arterial mesentérico quanto no PVAT dos animais tratados cronicamente com etanol, sugerindo aumento na geração de  $O_2^{\cdot-}$  via NADPH oxidase. Essa resposta foi mediada pelos MR, uma vez que o canrenoato de potássio preveniu esse efeito. Estudos mostram que o bloqueio dos MR anulam o estresse oxidativo, propondo que a formação de ERO seja mediada pelo receptor MR via ativação da NADPH oxidase (Callera *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2014), e essa resposta leva a alterações no vaso e no PVAT. O consumo de etanol promoveu lipoperoxidação no leito arterial mesentérico, achado esse que corrobora resultados prévios descritos por Passaglia *et al.* (2015). Adicionalmente, nossos resultados apontam para a participação dos MR na lipoperoxidação vascular e do PVAT, uma vez que o tratamento com canrenoato de potássio preveniu o aumento da concentração de MDA em ambos os tecidos. O  $O_2^{\cdot-}$  é uma ERO que ao se ligar aos lipídeos de membrana promove alteração de sua estrutura levando ao processo de lipoperoxidação. Essa reação altera a permeabilidade da membrana podendo causar danos ou disfunção tecidual. É importante notar que o canrenoato de potássio preveniu o aumento da geração de  $O_2^{\cdot-}$  e a lipoperoxidação induzida pelo etanol no leito arterial mesentérico e PVAT. Essas respostas sugerem que os MR induzem lipoperoxidação tecidual por promover aumento da geração de  $O_2^{\cdot-}$ .

O  $H_2O_2$  formado pela dismutação do  $O_2^{\cdot-}$  é uma molécula mais estável que o  $O_2^{\cdot-}$  e por esse motivo é a principal ERO relacionada a ativação da sinalização redox intracelular (Montazo e Touyz, 2012). De fato, o  $H_2O_2$  na aorta, atua como importante mediador do efeito anti-contrátil do PVAT por mecanismos que envolvem a abertura de canais para  $K^+$  e a ativação da enzima guanilato ciclase solúvel (Gao *et al.*, 2007). Assim, alteração da biodisponibilidade do  $H_2O_2$  poderia afetar o efeito anti-contrátil do PVAT. Nossos resultados mostraram que o consumo de etanol não modificou a concentração de  $H_2O_2$  no leito arterial mesentérico e no PVAT. Assim, a redução das concentrações de  $H_2O_2$  não figura como um mecanismo associado à alteração de fenótipo do PVAT induzida pelo etanol. Como mencionado anteriormente, o  $H_2O_2$  é

formado a partir do  $O_2^{\cdot-}$  pelas enzimas da família da SOD. Apesar do aumento dos níveis de  $O_2^{\cdot-}$  (substrato para produção de  $H_2O_2$ ) no PVAT de animais tratados com etanol, não houve aumento do  $H_2O_2$ .

Como nossos dados mostraram alteração no balanço no redox em ambos os tecidos em estudo e esses efeitos estariam sendo mediados pela ativação dos MR, avaliamos a defesa antioxidante, que é um mecanismo importante para neutralização dos efeitos deletérios causados por ERO. A enzima SOD é a primeira linha de defesa contra efeitos deletérios desencadeados pelas ERO, estando presente em diferentes compartimentos celulares sendo responsável por catalisar a dismutação do  $O_2^{\cdot-}$  em oxigênio e  $H_2O_2$  (Tagima *et al.*, 2009; Gongora *et al.*, 2015). Dessa maneira, o aumento da atividade da SOD estaria relacionado à redução das concentrações de  $O_2^{\cdot-}$ , diminuindo a quantidade dessa ERO disponível para reagir com lipídeos na membrana. Nossos dados apontaram que o bloqueio dos MR preveniu a redução da atividade total da SOD observada no LAM de animais tratados com etanol, no entanto não houve alteração da atividade da SOD no PVAT. Estudos prévios relataram a regulação positiva de enzimas antioxidantes (SOD e catalase) na vasculatura por bloqueio dos MR (Silva *et al.*, 2015). Em conjunto esses resultados sugerem que no LAM de animais tratados com etanol há diminuição da resposta antioxidante mediada pela ativação dos MR.

A catalase é uma metaloproteína responsável pela dismutação direta do  $H_2O_2$  em  $H_2O$  e  $O_2$  sendo essa a principal via dessa ERO (Gayatri Devi *et al.*, 2012). Essa enzima tem afinidade apenas por moléculas de baixo peso molecular, tais como o  $H_2O_2$ , não metabolizando moléculas grandes como os peróxidos lipídicos (Comhair e Erzurum, 2002) e atua de forma complementar ao sistema antioxidante das glutatonas, sendo mais eficiente que estas em altas concentrações de  $H_2O_2$ . É encontrada predominantemente no interior das células nos peroxissomas, mas pode também ser encontrada livre no citoplasma e nos fagolisossomos (Kinnula, 2005; Rahman *et al.*, 2006). Nesse presente estudo o consumo crônico de etanol não afetou a atividade tecidual da catalase no leito arterial mesentérico e no PVAT, esse mecanismo pode ser explicado por não haver aumento na concentração de  $H_2O_2$ , sendo este o principal alvo da ação antioxidante da catalase. Esse achado corrobora resultado prévio descrito por Simplicio *et al.* (2017) que avaliou a atividade da catalase em leito arterial mesentérico dos ratos tratados com etanol.

Avaliamos também a concentração de GSH reduzida, um tripeptídeo que compõe o sistema de defesa antioxidante não enzimática. O GSH promove proteção celular através remoção de metabólitos reativos por meio conjugação com as formas reativas, quando sintetizado e em associação com a síntese de GSSG, produz a manutenção do estado redox intracelular funcionando como um co-fator para enzimas citoplasmáticas e indutor de algumas modificações translacionais de proteína (Tapiero, 2003; Meister 1974). O bloqueio de MR diminuiu a produção de ERO, reduzindo o estresse oxidativo (Virides *et al.*, Silva *et al.*, 2015). Nossos dados mostraram que o tratamento com canrenoato de potássio aumentou a concentração de GSH no LAM, mostrando que o estresse oxidativo reduz a ação da defesa antioxidante não enzimática, e que os MR participam dessa resposta.

O PVAT influencia o tônus vascular por meio da liberação de fatores vasorelaxantes e vasoconstritores (Gálvez-Prieto *et al.*, 2012). É importante mencionar que dentre as substâncias vasorelaxante produzidas pelo PVAT temos as adipocinas (Szasz e Webb, 2012; Cheng *et al.*, 2018). A adiponectina é um hormônio proteico que pertence à classe das adipocinas que possuem efeito vascular. Essa proteína é secretada por células do tecido adiposo branco e modula diversos processos fisiológicos, como o metabolismo da glicose, dos ácidos graxos e das respostas imunes. Em relação à sua ação vascular, a adiponectina produzida no PVAT promove relaxamento via ativação da produção endotelial de NO e ações diretas no músculo liso vascular (Cheng *et al.*, 2018; Sowka e Dobrzyn, 2021). Em modelo de obesidade, Almabrouk *et al.* (2018) demonstraram que a perda do efeito anti-contrátil do PVAT foi associada à redução da produção de adiponectina. Nossos dados mostraram que consumo de etanol não afetou a produção de adiponectina no PVAT.

Avaliamos também a concentração da leptina, um peptídeo de função importante secretado também pelo PVAT. A leptina é um hormônio secretado principalmente pelo tecido adiposo, está relacionado com regulação do balanço energético, além do controle do estoque de energia, trabalhos mostram também a relação da leptina com sistema cardiovascular (Correia *et al.*, 2006; Maenhaut *et al.*, 2011). Estudo realizado por Lembo *et al.* (2000), mostra que a leptina induz a produção de NO, na presença ou ausência do endotélio, e de Fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) em artérias mesentéricas. A leptina reduz a contração estimulada por angiotensina II, por aumentar biodisponibilidade de NO (Rodríguez *et al.*, 2007). Pietro, *et al.* (2012),

mostraram que em modelo de hipertensão ocorre a perda de efeito anticonstrítil do PVAT e redução dos níveis de leptina. Nossos resultados mostram que o etanol diminuiu as concentrações de leptina e o bloqueio dos MR preveniu esse efeito. Os efeitos da leptina na vasculatura podem se dar de duas maneiras por vasoconstrição indireta, por estimular atividade simpática no hipotálamo, e por meio de vasodilatação direta, que depende de um endotélio íntegro e funcional, de acordo que os leitos vasculares (Elias *et al.*, 1998; Hall *et al.*, 2000). Dessa forma alterações na liberação de leptina podem alterar função vascular.

Em consequência das alterações observadas pelo consumo de etanol no balanço redox e na defesa antioxidante, avaliamos também se havia a participação de citocinas inflamatórias e se havia infiltração de células inflamatórias no PVAT e LAM. O aumento da produção de mediadores pró-inflamatórios na vasculatura é um processo característico da disfunção vascular em diferentes condições, como na hipertensão arterial sendo o SRAA importante mediador dessa resposta (Mikolajczyk *et al.*, 2016). De fato, nossos resultados mostraram que os animais que foram tratados com etanol apresentaram aumento nos níveis de TNF- $\alpha$  no leito arterial mesentérico e no PVAT, e que esse aumento foi prevenido pelo antagonista MR. Em suma nossos resultados sugerem que os MR induzem o aumento de ERO e também do TNF- $\alpha$ . Estudos descrevem o TNF- $\alpha$  como principal citocina mediadora do dano hepático associado ao consumo de etanol (Segawa *et al.*, 2008; Lv *et al.*, 2010), e na vasculatura contribuiu para o aumento do estresse oxidativo e redução da biodisponibilidade de NO (Simplicio *et al.*, 2017). O TNF- $\alpha$  induz a ativação da enzima NADPH oxidase com consequente aumento da geração de ERO (Yazdanpanah *et al.*, 2009). Dessa forma nossos resultados sugerem que o TNF- $\alpha$  ao ativar a NADPH oxidase poderia ser um mediador das ações dos MR. Foi observado por Medina *et al.*, (1999) adipócitos primários incubados com TNF- $\alpha$ , diminuíram a liberação de leptina. Dessa forma propomos que o aumento do TNF- $\alpha$  pode ser explicação para redução na liberação de leptina.

A MPO é uma enzima é considerada indicativo de acúmulo/ativação de neutrófilos (Ambrosone, 2000; He *et al.*, 2009; Koduru *et al.*, 2010; do Carmo *et al.*, 2012; Coelho 2013). Nossos dados mostraram que não houve diferença na concentração de MPO no LAM. No entanto observamos que consumo de etanol aumenta as concentrações de MPO no PVAT, efeito prevenido pelo bloqueio MR. Nossos resultados mostram que há uma possível infiltração de neutrófilos no PVAT,

caracterizando um processo inflamatório nesse tecido, inferindo também a participação dos MR nessa resposta inflamatória. A N - acetilglucosaminidase (NAG) é uma enzima lisossomal e sua atividade sérica pode ser empregada como meio de avaliação indireta da concentração ou ativação de macrófagos teciduais (Xavier *et al*, 2010; Lamaita *et al*, 2012; Coelho 2013). Em nossos resultados o consumo de etanol não alterou a concentração de NAG no LAM e PVAT.

## **6. CONCLUSÃO**

Nossos resultados evidenciam a participação dos MR no aumento da pressão arterial e nas disfunções vascular e do PVAT induzidas pelo consumo de etanol. Os MR modulam a indução de um fenótipo pró-contrátil do PVAT por um mecanismo que envolve o aumento da produção de ERO, via NADPH oxidase, e redução da concentração de leptina. O fenótipo pró-contrátil do PVAT também está associado a ações pró-inflamatórias mediadas pelos MR que envolvem aumento de TNF- $\alpha$  e de neutrófilos no PVAT. Os MR também participam das alterações de estado redox em vasos de resistência que foram caracterizadas por aumento de ERO, lipoperoxidação e redução da capacidade antioxidante enzimática. Assim, concluímos que os MR desempenham importante função nas alterações vasculares induzidas pelo consumo de etanol.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol.* 2003 Sep;3(9):745-56.
- Al-Lamki RS, Wang J, Skepper JN, Thiru S, Pober JS, Bradley JR. (2001) Expression of tumor necrosis factor receptors in normal kidney and rejecting renal transplants. *Lab Invest* 81(11): 1503–1515.
- Almeida, TSO; Fook, SML; Mariz, SR. Associação entre etilismo e HAS. *Revista saúde e ciência online.* 2016.
- Ames MK, Atkins CE, Pitt B. The renin-angiotensin-aldosterone system and its suppression. *J Vet Intern Med* 33(2):363-382, 2019.
- Altenhöfer S, Radermacher KA, Kleikers PW, Wingler K, Schmidt HH. Evolution of NADPH Oxidase Inhibitors: Selectivity and Mechanisms for Target Engagement. *Antioxid Redox Signal.* Feb. 2014.
- Andrade, AG. Álcool e a Saúde dos Brasileiros: Panorama 2020 / Organizador: Arthur Guerra de Andrade. – 1ed. – São Paulo: Centro de Informações sobre Saúde e Álcool (CISA), 2021. 152p.
- Ambrosone CB, Barlow WE, Reynolds W, Livingston RB, Yeh I-T, Choi J-Y, et al. Myeloperoxidase genotypes and enhanced efficacy of chemotherapy for early-stage breast cancer in SWOG-8897. *J Clin Oncol.*27(30):4973–9, 2009.
- Boucher JL, Moali C, Tenu JP. Nitric oxide biosynthesis, nitric oxide synthase inhibitors and arginase competition for L-arginine utilization. *Cell Mol Life Sci* 55:1015-28, 1999.
- Boydens C, Maenhaut N, Pauwels B, Decaluwé K, Voorde JV. Adipose Tissue as Regulator of Vascular Tone. *Curr Hypertens Rep* 14:270-278, 2012.
- Brunton LL, Dandan RH, Knollmann BC. As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman. 13.ed. cap.25, AMGH Editora Ltda. 2019.
- Caprio M, Feve B, Claes A, Viengchareun S, Lombes M, Zennaro MC. Pivotal role of the mineralocorticoid receptor in corticosteroid-induced adipogenesis. *FASEB J.* 21:2185–94.2007.
- Carey RM. Newly discovered components and actions of the renin-angiotensin system. *Hypertension* 62(5):818-22, 2013.
- Cat AND, Callera GE, Friederich-Persson M, Sanchez A, Dulak-Lis MG, Tsiropoulou S, Montezano AC, He Y, Briones AM, Jaisser F, Touyz RM. Vascular dysfunction in obese diabetic db/db mice involves the interplay between aldosterone/mineralocorticoid receptor and Rho kinase signaling. *Scientific Reports* 8:2952, 2018.
- Ceron CS, do Vale GT, Simplicio JA, Passaglia P, Ricci ST, Tirapelli CR. Data on the effects of losartan on protein expression, vascular reactivity and antioxidant capacity in the aorta of ethanol-treated rats. *Data Brief* 11:111-116, 2017.
- Comhair, S.A.A.; Erzurum, S.C. Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, v.283, p.L246-L255, 2002.
- Correia, M.L.G.; Rahmouni, K. - Role of leptin in the cardiovascular and endocrine complications of metabolic syndrome. *Diabetes Obes Metab.* 8:603–610 (2006).
- Chan TC, Sutter MC. Ethanol consumption and blood pressure. *Life Sci* 33(20):1965- 1973, 1983.
- Cheng CK, Bakar HA, Gollasch M, Huang Y. Perivascular Adipose Tissue: the Sixth Man of the Cardiovascular System. *Cardiovasc Drugs Ther* 32(5):481-502, 2018.
- Chia S., Qadan M., Newton R., Ludlam C. A., Fox K. A., Newby D. E. (2003) Intra- arterial tumor necrosis factor- $\alpha$  impairs endothelium-dependent vasodilatation and stimulates local tissue plasminogen activator release in humans. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23:695–701.
- Colafella KMM, Bovée DM, Danser AHJ. The renin-angiotensin-aldosterone system and its therapeutic targets. *Exp Eye Res.*2019.
- Coelho, Bertha Andrade. Avaliação da resposta inflamatória em mulheres com câncer de mama. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Medicina de Botucatu, 2013.
- Da Silva AL, Ruginsk SG, Uchoa ET, Crestani CC, Scopinho AA, Correa FM, De Martinis BS, Elias LL, Resstel LB, Antunes-Rodrigues J. Time-course of neuroendocrine changes and its correlation with hypertension induced by ethanol consumption. *Alcohol Alcohol.* 48(4):495-504, 2013.
- Das SK, Mukherjee S, Gupta G, Rao DN, Vasudevan DM. (2010) Protective effect of resveratrol and vitamin E against ethanol-induced oxidative damage in mice: biochemical and immunological basis. *Indian J Biochem Biophys.* 47(1):32-7.
- Do Vale GT, Simplicio JA, Gonzaga NA, Yokota R, Ribeiro AA, Casarini DE, de Martinis BS,

- Tirapelli CR. Nebivolol prevents vascular oxidative stress and hypertension in rats chronically treated with ethanol. *Atherosclerosis* 274:67-76,2018.
- Do Carmo RF, de Almeida DB, Aroucha DCBL, Vasconcelos LRS, de Moraes ACP, de Mendonça Cavalcanti MDS, et al. Plasma myeloperoxidase levels correlate with hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C. *Hum Immunol.*73(11):1127–31. 2012.
- Drummond GR, Selemidis S, Griendling KK, Sobey CG. Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* 10(6):453–471, 2011.
- El-Taouky MA, Salama SM, Abou-Shousha SA, Ismail SS, Saleh M. (2006) Effects of chronic ethanol and vitamin C administration on production of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in rats. *Egypt J Immunol.*13(1):1-10.
- Ensan S, Li A, Besla R, Degousee N, Cosme J, Roufaiel M *et al.* Self-renewing resident arterial macrophages arise from embryonic CX3CR1(+) precursors and circulating monocytes immediately after birth. *Nat Immunol* 17:159–168, 2016.
- Elias, C. F., Lee, C., Kelly, J., Aschkenasi, C., Ahima, R. S., Couceyro, P. R., Kuhar, M. J., Saper, C. B., and Elmquist, J. K. Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord. *Neuron* 21, 1375-1385, 1998.
- Feraco A et al. Minor role of mature adipocyte mineralocorticoid receptor in high fat induced obesity. *The Journal of Endocrinology.* 2018;239(2):229-240.
- Fuchs FD, Chambless LE, Whelton PK, Nieto FJ, Heiss G. Alcohol consumption and the incidence of hypertension. The atherosclerosis risk in communities study. *Hypertension*37:1242-50, 2001.
- Gao YJ. Dual modulation of vascular function by perivascular adipose tissue and its potential correlation with adiposity/lipoatrophy-related vascular dysfunction. *Curr Pharm Des* 13(21):2185-2192, 2007.
- Gayatri Devi, S.; Jayalakshmi, S. K.; Sreeramulu, K. Salicylic acid is a modulator of catalase isozymes in chickpea plants infected with *Fusarium oxysporum* f. sp. Ciceri. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 52, p. 154-161, 2012.
- Gálvez P, B; Somoza, B; Gil-Ortega, M; García-Prieto, C F; Heras, Ana IL; González, MC; Arribas, S; Arangué, I; Bolbrinker, J; Kreutz, R. Anticontractile Effect of Perivascular Adipose Tissue and Leptin are Reduced in Hypertension. *Frontiers In Pharmacology*, [s.l.], v. 3, p. 1-8, 2012.
- Greenstein AS, Khavandi K, Withers SB, Sonoyama K, Clancy O, Jeziorska M, et al. Local inflammation and hypoxia abolish the protective anticontractile properties of perivascular fat in obese patients. *Circulation.* 2009;119:1661–1670.
- Griendling KK, Fitzgerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury. Part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation* 108:1912-916, 2003.
- Guo C, Ricchiuti V, Lian BQ, Yao TM, Coutinho P, Romero JR, Li J, Williams GH, Adler GK. Mineralocorticoid receptor blockade reverses obesity-related changes in expression of adiponectin, peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, and proinflammatory adipokines. *Circulation* 2008;117:2253–61.
- Hall JE. *Tratado de fisiología médica.* 13.ed. cap.19 Elsevier editor ltda, 2017.
- Hall, J. E., Brands, M. W., Hildebrandt, D. A., Kuo, J., and Fitzgerald, S. Role of sympathetic nervous system and neuropeptides in obesity hypertension. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 33, 605–618, 2000.
- Hattangady N, Olala L, Bollag WB, Rainey WE. Acute and chronic regulation of aldosterone production. *Mol Cell Endocrinol* 350(2):151-162, 2012.
- Hatton DC, Bukoski RD, Edagr S, McCarron DA. Chronic alcohol consumption lowers blood pressure but enhances vascular contractility in Wistar rats. *J Hypertension* 10:529-537, 1992.
- Hayakawa T et al. Impact of MR on mature adipocytes in high-fat/highsucrose diet- induced obesity. *The Journal of Endocrinology.*239(1):63-71, 2018.
- He C, Tamimi RM, Hankinson SE, Hunter DJ, Han J. A prospective study of genetic polymorphism in MPO, antioxidant status, and breast cancer risk. *Breast Cancer Res Tr.*113(3):585–94, 2009.
- Hipolito UV, Rocha JT, Martins-Oliveira A, Tirapelli DP, Jacob-Ferreira A, Batalhão ME, Tanus-Santos JE, Carnio EC, Cunha TM, Queiroz RH, Tirapelli CR. Chronic ethanol consumption reduces adrenomedullin-induced relaxation in the isolated rat aorta. *Alcohol* 45(8):805-14, 2011.
- Hirata A et al. Blockade of mineralocorticoid receptor reverses adipocyte dysfunction and insulin resistance in obese mice. *Cardiovascular Research.* 84(1):164-17.2009.
- Hirata A et al. Contribution of glucocorticoid-mineralocorticoid receptor pathway on the obesity-related adipocyte dysfunction. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 419(2):182-187.2012.
- Husain K, Mejia J, Lalla J, Kazim S. Time response of alcohol-induced alterations in blood pressure, nitric oxide and oxidant to antioxidant balance in the plasma of rats. *Exp Clin Cardiol* 9(4):229-34, 2005.

- Husain K, Scott BR, Reddy SK, Somani SM. Chronic ethanol and nicotine interaction on rat tissue antioxidant defense system. *Alcohol* 25(2):89-97, 2001.
- Husain K, Vazquez M, Ansari RA, Malafa MP, Lalla J. Chronic alcohol-induced oxidative endothelial injury relates to angiotensin II levels in the rat. *Mol Cell Biochem* 307(1-2):51-8, 2008.
- Klatsky AL, Friedman GD, Armstrong MA. The relationships between alcoholic beverage use and other traits to blood pressure: a new Kaiser Permanente study. *Circulation* 73:628-636, 1986.
- Klatsky AL, Friedman GD, Siegeland AB, Gerard MJ. Alcohol consumption and blood pressure. *N Engl J Med* 296:1194-1200, 1977.
- Kinnula, V.L. et al. Generation and disposal of reactive oxygen metabolites in the lung. *Laboratory Investigation*, v.73, n.1, p.3-19, 1995.
- Koken T, Gursoy F, Kahraman A. (2010) Long-term alcohol consumption increases pro-matrix metalloproteinase-9 levels via oxidative stress. *J Med Toxicol*.6(2):126-30.
- Kolkhof P, Barfacker L. Mineralocorticoid receptor antagonists: 60 years of research and development. *J Endocrinol* 234(1):125-140, 2017.
- Koduru B, Tejaswini, Thakur A, Kamath SU, Shenoy KR, Kamath U, et al. Indicators of oxidative stress in thyroid cancer. *Indian J Biochem Bio*. 47(2):121-3. 2010.
- Krysiak R, Okopien B. The effect of treatment on monocyte and lymphocyte cytokine release in patients with aldosteronoma. *Hypertens Res* 2012; 35:123-125.
- Lands, W.E.M. - A summary of the workshop: alcohol and calories: a matter of balance. *J Nutr* 123: 1338-1341, 1993.
- Larue- Achagiotis C, Poussard AM, Louis-Sylvestre, J. Alcohol drinking, food and fluid intakes and body weight gain in rats. *Physiology and Behavior* 47:545-548, 1990.
- Latouche C, El-Moghrabi S, Messaoudi S, Cat AND, Hernandez-Diaz I, Rosa DA, Perret C, Andrés NL, Rossignol P, Zannad F, Farman N, Jaïsser. Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin Is a Novel Mineralocorticoid Target in the Cardiovascular System. *Hypertension* 59(5):966-972, 2012.
- Lamaita RM, Pontes A, Belo AV, Caetano JP, Andrade SP, Cândido EB, et al. Evaluation of N-acetylglucosaminidase and myeloperoxidase activity in patients with endometriosis-related infertility undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Journal Obstet Gynaecol Re*.38(5):810-6, 2012.
- Lefranc C, Friederich-Persson M, Braud L, Palacios-Ramirez R, Karlsson S, Boujardine N, Motterlini R, Jaïsser F, Cat AND. MR (Mineralocorticoid Receptor) Induces Adipose Tissue Senescence and Mitochondrial Dysfunction Leading to Vascular Dysfunction in Obesity. *Hypertension* 73(2):458-468, 2019.
- Lembo, G; Vecchione, C; Fratta, L; Marino, G; Trimarco, V; D'amati, G; Trimarco, B. - Leptin induces direct vasodilation through distinct endothelial mechanisms. *Diabetes*. 49(2):293-7, 2000.
- Lin HZ, Yang SQ, Zeldin G, Diehl AM. (1998) Chronic ethanol consumption induces the production of tumor necrosis factor-alpha and related cytokines in liver and adipose tissue. *Alcohol Clin Exp Res*.22(5 Suppl):231S-237S.
- Lohn M, Dubrovskaja G, Lauterbach B, Luft FC, Gollasch M, Sharma AM. Periadventitial fat releases a vascular relaxing factor. *Faseb J* 16:1057-1063, 2002.
- Lv X, Chen Z, Li J, Zhang L, Liu H, Huang C, Zhu P. (2010) Caffeine protects against alcoholic liver injury by attenuating inflammatory response and oxidative stress. *Inflamm Res*.59(8):635-45.
- MacMahon SW, Blackett RB, Macdonald GJ, Hall W. Obesity, alcohol consumption and blood pressure in Australian men and women. *J Hypertens* 2:85-91, 1984.
- MacMahon SW. Alcohol consumption and hypertension. *Hypertension* 9(2):111-121, 1987.
- Marchi KC, Ceron CS, Muniz JJ, De Martinis BS, Tanus-Santos JE, Tirapelli CR. NADPH Oxidase Plays a Role on Ethanol-Induced Hypertension and Reactive Oxygen Species Generation in the Vasculature. *Alcohol* 51(5):522-34, 2016.
- Martín-Fernández B, Rubio-Navarro A, Cortegano I, Ballesteros S, Alía M, Cannata-Ortiz P, Olivares-Álvaro E, Egido J, de Andrés B, Gaspar ML, de las Heras N, Lahera V, Moreno JA. Aldosterone induces renal fibrosis and inflammatory M1- macrophage subtype via mineralocorticoid receptor in rats. *PLoS One* 2016.
- Mathews JD. Alcohol usage a possible explanation for the socio-economic and occupational differentials in mortality from hypertension and coronary heart disease in England and Wales. *Aust NZ J Med* (6):393-7, 1976.
- Mattos BR, Bonacio GF, Vitorino TR, Garcia VT, Amaral JH, Dellalibera-Joviliano R, Franca SC,

- Tanus-Santos JE, Rizzi E. TNF- $\alpha$  inhibition decreases MMP-2 activity, reactive oxygen species formation and improves hypertensive vascular hypertrophy independent of its effects on blood pressure. *Biochem Pharmacol*. 2020 Oct;180:114121.
- Maenhaut, N.; Van de Voorde, J. - Regulation of vascular tone by adipocytes. *BMC Med*. 16:9-25 (2011).
- Medina, EA; Stanhope KL, Mizuno, TM; Mobbs CV; Gregorie, F; Hubbard NE; Erickson KL; Havel PJ. Effects of tumor necrosis factor alpha on leptin secretion and gene expression: relationship to changes of glucose metabolism in isolated rat adipocytes. *International Journal of Obesity*. 23,896-903.1999.
- Miura R, Nakamura K, Miura D, Miura A, Hisamatsu K, Kajiya M, Hashimoto K, Nagase S, Morita H, Fukushima Kusano K, Emori T, Ishihara K, Ohe T. Aldosterone synthesis and cytokine production in human peripheral blood mononuclear cells. *J Pharmacol Sci*. 2006 Nov;102(3):288-95.
- Monnens L, Levtchenko E. Distinction between Liddle syndrome and apparent mineralocorticoid excess. *Pediatr Nephro*.19:118–19. 2004.
- Nakamura M., Yoshida H., Arakawa N., Saitoh S., Satoh M., Hiramori K. (2000) Effects of tumor necrosis factor- $\alpha$  on basal and stimulated endothelium-dependent vasomotion in human resistance vessel. *J. Cardiovasc. Pharmacol*. 36:487–492.
- Nakano S, Kobayashi N, Yoshida K, Ohno T, Matsuoka H. Cardioprotective mechanisms of spironolactone associated with the angiotensin-converting enzyme/epidermal growth factor receptor/extracellular signal-regulated kinases, NAD(P)H oxidase/lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1, and Rho-kinase pathways in aldosterone/salt-induced hypertensive rats. *Hypertens Res*. 28(11):925-936, 2005.
- Nguyen Dinh Cat A et al. Adipocyte-specific mineralocorticoid receptor overexpression in mice is associated with metabolic syndrome and vascular dysfunction: Role of redox-sensitive PKG-1 and rho kinase. *Diabetes*.65(8):2392-2403, 2006.
- Nguyen Dinh Cat A, Briones AM, Callera GE, Yogi A, He Y, Montezano AC, Touyz RM. Adipocyte-derived factors regulate vascular smooth muscle cells through mineralocorticoid and glucocorticoid receptors. *Hypertension* 2011;58:479–88.
- Nieminen MM, Fyhrquist F, Linkola J, Tikkanen I, Tontti K. Renin-aldosterone axis in ethanol intoxication. *Pharmacol Biochem Behav* 15(6):879-82, 1981.
- Nosalski R, Guzik TJ. Perivascular adipose tissue inflammation in vascular disease. *Br J Pharmacol* 174(20):3496-3513, 2017.
- O'Keefe EL, DiNicolantonio JJ, O'Keefe JH, Lavie CJ. Alcohol and CV Health: Jekyll and Hyde J-Curves. *Prog Cardiovasc Dis*. 2018 May-Jun;61(1):68-75.
- Passaglia P, Ceron CS, Mecawi AS, Antunes-Rodrigues J, Coelho EB, Tirapelli CR. Angiotensin type 1 receptor mediates chronic ethanol consumption-induced hypertension and vascular oxidative stress. *Vascul Pharmacol* 74:49-59, 2015.
- Pinardi G, Brieva C, Vinet R, Penna M. Effects of chronic ethanol consumption on  $\alpha$ -adrenergic-induced contractions in rat thoracic aorta. *Gen Pharmacol*23(2):245-248, 1992.
- Piano, M. R. Alcohol's Effects on the Cardiovascular System. *Alcohol Res*. 2017. Plotnikov M.B., Shamanaev A.Y., Aliev O.I., Sidekhenova A.V., Anishchenko A.M., Arkhipov A.M., Pentoxifylline treatment enhances anti-hypertensive activity of captopril through hemorheological improvement in spontaneously hypertensive rats during development of arterial hypertension, *J. Am. Soc. Hypertens*. 11 (11) (2017) 769–778.
- Polikandriotis JA, Rupnow HL, Elms SC, Clempus RE, Campbell DJ, Sutliff RL, Brown LA, Guidot DM, Hart CM. Chronic ethanol ingestion increases superoxide production and NADPH oxidase expression in the lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 34(3):314-9, 2006.
- Rahman, I. et al. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. *European Journal of Pharmacology*, v.533, n.1-3, p.222-239, 2006.
- Raz-Pasteur A, Gamliel-Lazarovich A, Coleman R, Keidar S. Eplerenone reduced lesion size in early but not advanced atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Cardiovasc Pharmacol* 2012; 60:508–512.
- Rocha JT, Hipólito UV, Martins-Oliveira A, Tirapelli DP, Batalhão ME, Carnio EC, Queiroz RH, Coelho EB, Cunha TM, Tanus-Santos JE, Tirapelli CR. Ethanol consumption alters the expression and reactivity of adrenomedullin in the rat mesenteric arterial bed. *Alcohol Alcohol* 47(1):9-17, 2012.
- Rodríguez, A.; Fortuño, A.; Gómez-Ambrosi, J.; Zalba, G.; Díez, J.; Frühbeck, G. - The inhibitory effect of leptin on angiotensin II-induced vasoconstriction in vascular smooth muscle cells is mediated via a nitric oxide dependent mechanism. *Endocrinology*,148(1): 324-31, 2007.

- Rodiño-Janeiro BK, Paradela-Dobarro B, Castiñeiras-Landeira MI, Raposeiras-Roubín S, González-Juanatey JR, Alvarez E. Current status of NADPH oxidase research in cardiovascular pharmacology. *Vasc Health Risk Manag* 9:401-28, 2013.
- Roh M., Zhang Y., Murakami Y., Thanos A., Lee S.C., Vavvas D.G., Benowitz L.I., Miller J.W., Etenarcept, a widely used inhibitor of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha), prevents retinal ganglion cell loss in a rat model of glaucoma, *PLoS ONE* 7. 2012.
- Rosa FLR; Antonini, SRR. Resistência aos Mineralocorticóides: Pseudo - hipoaldosteronismo Tipo 1ª. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 51/3, 2007.
- Rubanyi GM, Vanhoutte PM. Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol* 250:H822-H827, 1986.
- Schenkel JM, Fraser KA, Beura LK, Pauken KE, Vezys V, Masopust D. T cell memory. Resident memory CD8 T cells trigger protective innate and adaptive immune responses. *Science* 346:98-101, 2014.
- Segawa S, Wakita Y, Hirata H, Watari J. (2008) Oral administration of heat-killed *Lactobacillus brevis* SBC8803 ameliorates alcoholic liver disease in ethanol-containing diet-fed C57BL/6N mice. *Int J Food Microbiol.* 128(2):371-7.
- Silva MA et al. Spironolactone treatment attenuates vascular dysfunction in type 2 diabetic mice by decreasing oxidative stress and restoring NO/GC signaling. *Frontiers in Physiology.* 6:269. 2015.
- Silva MAB, Bruder-Nascimento, T, Cau SBA, Lopes RAM, Mestriner FLAC, Fais RS, Touyz RM, Tostes RC. Spironolactone treatment attenuates vascular dysfunction in type 2 diabetic mice by decreasing oxidative stress and restoring NO/GC signaling. *Front Physiol.* 2015; 6: 269.
- Silva, Thiago Fernandes da. Et al. O envolvimento do sistema Renina-Angiotensina nas disfunções cardiovasculares e seus recursos farmacológicos. *Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento.* Ano 04, Ed. 11, Vol. 02, pp. 181-196. 2019.
- Simplicio JA, do Vale GT, Gonzaga NA, Leite LN, Hipólito UV, Pereira CA, Tostes RC, Tirapelli CR. Reactive oxygen species derived from NAD(P)H oxidase play a role on ethanol-induced hypertension and endothelial dysfunction in rat resistance arteries. *J Physiol Biochem* 73(1):5-16, 2017a.
- Simplicio JA, Gonzaga NA, Nakashima MA, De Martinis BS, Cunha TM, Tirapelli LF, Tirapelli CR. Tumor necrosis factor- $\alpha$  receptor 1 contributes to ethanol-induced vascular reactive oxygen species generation and hypertension. *J Am Soc Hypertens* 11(10):684-696.e3, 2017b.
- Souza, DSM. Alcool e hipertensão. Aspectos epidemiológicos, fisiopatológicos e clínicos. *Revista brasileira de hipertensão.* Vol 21(2). 2014.
- Soltis EE, Cassis LA. Influence of perivascular adipose tissue on rat aortic smooth muscle responsiveness. *Clin Exp Hypertens* 13:277-296, 1991.
- Suter, P.M. - Is alcohol consumption a risk factor for weight gain and obesity? *Crit Rev Clin Lab Sci* 42(3): 197-227, 2005.
- Suter, P.M.; Hasler, E.; Vetter, W. - Effects of alcohol on energy metabolism and body weight regulation: is alcohol a risk factor for obesity? *Nutrition Reviews* 55(5): 157- 171, 1997.
- Sprague AH, Khalil RA. (2009) Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. *Biochem Pharmacol* 78:539-552.
- Stewart CW, Kennedy RH. Effects of chronic ethanol consumption on aortic constriction in male and female rats. *Eur J Pharmacol* 366:55-60, 1999.
- Szasz T, Webb RC. Perivascular adipose tissue: more than just structural support. *Clin Sci* 122:1-12, 2012.
- Tirapelli CR, Al-Khoury J, Bkaily G, D'Orleans-Juste P, Lanchote VL, Uyemura SA, de Oliveira AM. Chronic ethanol consumption enhances phenylephrine-induced contraction in the isolated rat aorta. *J Pharmacol Exp Ther* 316:233-241, 2006b.
- Tirapelli CR, Casolari DA, Montezano AC, Yogi A, Tostes RC, Legros E, D'Orléans-Juste P, Lanchote VL, Uyemura SA, de Oliveira AM. Ethanol consumption enhances endothelin-1-induced contraction in the isolated rat carotid. *J Pharmacol Exp Ther* 318(2):819-27, 2006a.
- Tirapelli CR, Leone AF, Yogi A, Tostes RC, Lanchote VL, Uyemura SA, Resstel LB, Corrêa FM, Padovan CM, de Oliveira AM, Coelho EB. Ethanol consumption increases blood pressure and alters the responsiveness of the mesenteric vasculature in rats. *J Pharm Pharmacol* 60(3):331-341, 2008.
- Touyz RM, Briones AM. Reactive oxygen species and vascular biology: implications in human hypertension. *Hypertens Res* 34:5-14, 2011.
- Touyz RM, Schiffrin EL. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev* 52(4):639-72, 2000.

- Tran L.T., MacLeod K.M., McNeill J.H., Chronic etanercept treatment prevents the development of hypertension in fructose-fed rats, *Mol. Cell. Biochem.* 330 (1–2) (2009) 219–228.
- Trayhurn P, Wang B, Wood IS. Hypoxia in adipose tissue: a basis for the dysregulation of tissue function in obesity? *Br J Nutr.* 2008;100:227–235.
- UsherMG, DuanSZ, IvaschenkoCY, FrielerRA, BergerS, SchutzG, LumengCN, MortensenRM. Myeloid mineralocorticoid receptor controls macrophage polarization and cardiovascular hypertrophy and remodeling in mice. *J Clin Invest* 2010; 120:3350– 3364.
- Van der Heijden CDCC, Deinum J, Joosten LAB, Netea MG, Riksen NP. The mineralocorticoid receptor as a modulator of innate immunity and atherosclerosis. *Cardiovasc Res.* 2018 Jun 1;114(7):944-953.
- Van der Heijden CDCC, Smeets EMM, Aarntzen EHJG, Noz MP, Monajemi H, KerstenS, Kaffa C, Hoischen A, Deinum J, Joosten LAB, Netea MG, Riksen NP. Arterial Wall Inflammation and Increased Hematopoietic Activity in Patients With Primary Aldosteronism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2020 May 1;105(5):e1967-80.
- Vergaro G, Preud'homme M, Fazal L, Merval R, Passino C, Emdin M, Samuel JL, Solal AC, Delcayre C. Inhibition of Galectin-3 Pathway Prevents Isoproterenol- Induced Left Ventricular Dysfunction and Fibrosis in Mice. *Hypertension* 67(3):606-612, 2016.
- Vermot, A; Härtle, IP; Smith, SME; Fieschi, F. NADPH Oxidases (NOX): An Overview from Discovery, Molecular Mechanisms to Physiology and Pathology. *Antioxidants (Basel).* v.10(6); Jun. 2021.
- Virdis A, Neves MF, Amiri F, Viel E, Touyz RM, Schiffrin EL. Spironolactone improves angiotensin-induced vascular changes and oxidative stress. *Hypertension* 40(4):504-10, 2002.
- Watts SW, Gollasch M. Editorial: Perivascular Adipose Tissue (PVAT) in Health and Disease. *Front Physiol* 9:1004, 2018.
- Wei Z, Spizzo I, Diep H, Drummond GR, Widdop RE, Vinh A. Differential phenotypes of tissue-infiltrating T cells during angiotensin II-induced hypertension in mice. *PLoS One* 9: e114895, 2014.
- Withers SB et al. Macrophage activation is responsible for loss of anticontractile function in inflamed perivascular fat. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 31(4):908-913, 2011.
- Xavier DO, Amaral LS, Gomes M a, Rocha M a, Campos PR, Cota BDCV, et al. Metformin inhibits inflammatory angiogenesis in a murine sponge model. *Biomed Pharmacother.* 64(3):220–5. 2010.
- Yazdanpanah B, Wiegmann K, Tchikov V, Krut O, Pongratz C, Schramm M, Kleinridders A, Wunderlich T, Kashkar H, Utermöhlen O, Brüning JC, Schütze S, Krönke M. (2009) Riboflavin kinase couples TNF receptor 1 to NADPH oxidase. *Nature.* 460(7259):1159-63.
- 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* 92:S31- S34, 2004.
- Zang Z., Li S., Lin Y., Li X., Li Y., Qin Y., Wang H., Jiang M., Zhu L., Pentoxifylline prevents dexamethasone-induced myocardial fibrosis and apoptosis in rats, *Int Heart J* 56 (6) (2015) 651–655.
- Zhang H, Park Y, Wu J, Chen X, Lee S, Yang J, Dellsperger KC, Zhang C. (2009) Role of TNF- $\alpha$  in vascular dysfunction. *Clin Sci (Lond)* 116(3):219-30.