

Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

ARTHUR HENRIQUE DE SOUSA

Participação da interleucina-6 no aumento da pressão arterial e dano oxidativo vascular induzidos pelo consumo crônico de etanol.

Ribeirão Preto

2023

ARTHUR HENRIQUE DE SOUSA

Participação da interleucina-6 no aumento da pressão arterial e dano oxidativo vascular induzidos pelo consumo crônico de etanol.

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Renato Tirapelli

Ribeirão Preto

2023

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

De Sousa, Arthur Henrique

Participação da interleucina-6 no aumento da pressão arterial e dano oxidativo vascular induzidos pelo consumo crônico de etanol.

53 folhas.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Tirapelli, Carlos Renato.

Etanol, IL-6, estresse oxidativo, tecido adiposo perivascular (PVAT), pressão arterial.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Arthur Henrique de Sousa

Título: Participação da interleucina-6 no aumento da pressão arterial e dano oxidativo vascular induzidos pelo consumo crônico de etanol.

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Concentração: Farmacologia.

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof. Dr. Carlos Renato Tirapelli – Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto – EERP/USP

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.

Julgamento: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, sem dúvidas, agradeço à minha família, que sempre esteve presente durante todo o meu processo de formação. Tenho a plena convicção de que nada se conquista sozinho, e sem essas pessoas que são parte da minha vida desde sempre, nada seria possível. Aos meus pais, Areni e Rufino, que sempre me proporcionaram todas as condições para que eu pudesse concluir essa etapa da minha vida. Nunca conseguirei agradecer por tudo que vocês fizeram por mim, vocês são minhas inspirações maiores! Aos meus irmãos e irmãs, Elaine, Elisângela, Sidney, Sérgio e Anderson, que também nunca deixaram de me apoiar independentemente da situação, e que dividiram comigo momentos que guardarei para sempre. Aos meus cunhados/cunhadas, sobrinhos, primos e outras pessoas que considero como família, que sempre estiveram presentes e permitiram que eu tivesse um ambiente familiar saudável, me ajudando muito a enfrentar todos os desafios encontrados durante minha vida e formação. Vocês todos são meus portos seguros, e me sinto muito privilegiado por ter vocês por perto sempre! Esse título também é de vocês! Obrigado!

Agradeço também aos meus amigos, que com certeza permitiram com que eu evoluísse como pessoa e que levarei para sempre em meu coração. Agradeço em especial ao irmão que a graduação me deu o privilégio de conhecer. Kiwi, você é e sempre será um exemplo de pessoa/profissional que inspira todos a sua volta, e um amigo que com certeza eu vou levar para toda vida! Só nós sabemos por quantas histórias já passamos e espero que possamos relembrar todas elas por muito tempo. Agradeço aos amigos que tive a oportunidade de conhecer durante toda minha formação, desde o início da graduação até o fim desse mestrado, Japa, Bruninha, Thainá, Júlio, Paulinho, Gabs, entre outros que, apesar de não citados, com certeza marcaram minha vida. Vocês são muito importantes para mim, e espero que essa relação que construímos não se perca nunca! Ainda quero muitos Interenfs, Tuscas, entre outros momentos especiais com vocês!

Não posso deixar de falar também o quanto sou grato por ter encontrado na graduação uma pessoa que quero ao meu lado para sempre, todos os dias e independente de qualquer coisa. Daiane/Nan, você é uma das pessoas mais maravilhosas que eu já conheci em toda minha vida! Nunca convivi com uma pessoa que fosse tão alegre, generosa e autêntica em todos os sentidos. Você tem um coração que não cabe em você

e que emite alegria por onde passa! Muito obrigado por me deixar fazer parte da sua vida. Eu tenho certeza que encontrei em você muito mais que uma namorada, mas também uma amiga/parceira com quem eu sei que posso contar pra toda e qualquer coisa e que vai me apoiar em todas minhas escolhas, e eu espero que você saiba que também vou estar aqui sempre para o que você precisar. Muito obrigado por toda a força durante essa pós-graduação, parte dela com certeza também é sua. Eu te amo!

Por fim, gostaria de agradecer a todos meus colegas de laboratório, que me deram toda a força possível para chegar até aqui, me ajudando a superar todos os obstáculos no caminho. Agradeço especialmente ao meu orientador, professor doutor Carlos Renato Tirapelli, que desde minha entrada no laboratório, em 2017, foi muito importante para minha trajetória. Professor, mesmo diante de todos os desafios que encontrei durante essa etapa, você esteve presente e aberto para que pudéssemos trabalhar juntos uma maneira de superá-los. Por isso e por muitas outras coisas que tivemos a oportunidade de realizar juntos durante esses anos, eu sou genuinamente grato! Você é um exemplo de profissional em todas suas funções, dentro e fora da sala de aula! Ademais, gostaria de agradecer em especial meus colegas de laboratório Victor, Gustavo, Thales, Wanessa. Vocês foram parte importantíssima da minha formação e me ajudaram demais, dentro e fora do laboratório, a alcançar tudo isso! Muito obrigado!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001. Meu agradecimento também a essa agência de fomento que, sem dúvidas, também foi essencial para a execução desse projeto.

Enfim, a todos os citados e aos que talvez eu tenha deixado de citar, muito obrigado! Todos fizeram e fazem parte da minha vida, e espero que eu tenha agregado, com coisas boas, à vida de vocês também! Espero que vocês tenham uma trajetória maravilhosa pela frente, que vai ser mais merecida impossível!

Muito obrigado!

“O homem não é nada além daquilo que a educação faz dele.”

Immanuel Kant

RESUMO

DE SOUSA, AH: **Participação da interleucina-6 no aumento da pressão arterial e dano oxidativo vascular induzidos pelo consumo crônico de etanol.** 2023. 53 folhas. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2023.

O consumo crônico de etanol atua como um importante fator de risco no desenvolvimento de doenças cardiovasculares, provocando danos vasculares através de mecanismos que envolvem a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e aumento do estresse oxidativo. A interleucina (IL)-6 é uma citocina pró-inflamatória considerada como biomarcador de doenças cardiovasculares. O aumento de ERO está relacionado ao aumento na produção de IL-6, citocina que atua na regulação da geração das ERO via enzima NAD(P)H oxidase, processo que promove aumento do estresse oxidativo e danos vasculares. No entanto, não há dados na literatura acerca da contribuição da IL-6 nos danos oxidativos e disfunção vascular induzidos pelo consumo de etanol. A inflamação vascular promovida pelo etanol pode envolver também a participação do tecido adiposo perivascular (*perivascular adipose tissue* - PVAT), tecido reconhecido como uma importante fonte de adipocinas e citocinas pró-inflamatórias, incluindo a IL-6. Por isso, testamos a hipótese de que o consumo crônico de etanol promoveria aumento da IL-6 que, por sua vez, modularia os efeitos deletérios relacionados ao estresse oxidativo no leito arterial mesentérico (LAM), e que o PVAT participaria dessa resposta por ser uma importante fonte de IL-6. Para isso, camundongos machos C57BL/6 (20 – 25g) ou nocautes para a IL-6 foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos: Controle (*wild type*, WT), etanol 20% (vol./vol.), IL-6^{-/-} (nocaute para IL-6) e etanol IL-6^{-/-}. Os animais tratados com etanol apresentaram aumento da pressão arterial, resposta que teve um início tardio nos animais IL-6^{-/-} submetidos ao mesmo tratamento. Associado a essa resposta, o consumo de etanol induziu aumento dos níveis plasmáticos e teciduais de IL-6. No LAM, esse aumento foi observado apenas nas amostras contendo PVAT. Um dos primeiros processos observados em quadros de inflamação vascular é o aumento da infiltração de células imunes. Nesse contexto, o consumo de etanol promoveu o aumento da infiltração de neutrófilos em LAM de camundongos, resposta que foi totalmente prevenida nos animais IL-6^{-/-}, indicando que a IL-6 participa dessa resposta. Além disso, o consumo de etanol promoveu aumento do estresse oxidativo, caracterizado pelo aumento da geração de superóxido (O₂⁻), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e peroxidação lipídica, mensurada por meio dos níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). O aumento da geração de O₂⁻ e H₂O₂ teciduais foi de maior magnitude nas amostras contendo PVAT, indicando que esse tecido participa da geração dessas ERO. A ausência da IL-6, apenas nas amostras de LAM contendo PVAT, foi capaz de prevenir parcialmente o aumento de O₂⁻ e TBARS, e prevenir totalmente o aumento de H₂O₂, indicando que essa citocina participa da geração dessas moléculas. Ainda, a ausência da IL-6 preveniu o aumento dos níveis plasmáticos de TBARS. Sobre a maquinaria antioxidante, o etanol promoveu aumento da atividade da SOD nas amostras contendo PVAT e essa resposta foi prevenida pela ausência da IL-6. Não foram observadas diferenças significativas quanto à atividade da enzima catalase. Com base nesses resultados, concluímos que a IL-6 participa, de maneira dependente do PVAT, do aumento do estresse oxidativo induzido pelo consumo crônico de etanol. Demonstramos ainda, pela primeira vez, que a IL-6 está envolvida no aumento inicial da pressão arterial induzido pelo consumo crônico de etanol.

Palavras-chave: Etanol; IL-6; estresse oxidativo; tecido adiposo perivascular (PVAT), pressão arterial.

ABSTRACT

DE SOUSA, AH: **Involvement of interleukin-6 in the increased blood pressure and oxidative vascular damage induced by chronic ethanol consumption.** 2023. 53 sheets. Master's Thesis – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2023.

Chronic ethanol consumption acts as an important risk factor in the development of cardiovascular diseases, provoking vascular damage through mechanisms that involves reactive oxygen species (ROS) formation and increased oxidative stress. Interleukin (IL)-6 is a pro-inflammatory cytokine that is considered as a biomarker of cardiovascular diseases. The increase in ROS generation is related to augmented of IL-6 production, a cytokine that regulates the generation of ROS via the NAD(P)H oxidase enzyme, then promoting increased oxidative stress and vascular damage. However, there are no literature data on the contribution of IL-6 in oxidative damage and vascular dysfunction induced by ethanol consumption. Vascular inflammation promoted by ethanol may also involve the participation of perivascular adipose tissue (PVAT), a tissue that is recognized as an important source of adipokines and pro-inflammatory cytokines, including IL-6. Therefore, we tested the hypothesis that chronic ethanol consumption would promote an increase in IL-6 production that could modulate the deleterious effects related to oxidative stress in the mesenteric arterial bed (MAB), and PVAT would participate in this response by acting as an important source of IL-6. With this purpose, C57BL/6 mice or IL-6 knockout mice were randomly distributed into 4 groups: Control (wild type, WT), ethanol 20% (vol/vol), IL-6^{-/-} (knockout for IL-6 gene) and ethanol IL-6^{-/-}. Animals treated with ethanol presented increase in blood pressure, response that was partially prevented in IL-6^{-/-} animals submitted to the same treatment. Added to this response, ethanol consumption also induced increased plasmatic and tissue levels of IL-6. In the MAB, this increase was observed only in samples containing PVAT. One of the first responses observed in vascular inflammation is the increased infiltration of immune cells. In that regard, ethanol consumption promoted increase in neutrophil infiltration in mice MAB, response that was totally prevented in IL-6^{-/-} animals, indicating that IL-6 participates in this response. Furthermore, ethanol consumption induced increased oxidative stress, characterized by augmented generation of superoxide (O₂⁻), hydrogen peroxide (H₂O₂) and lipoperoxidation, measured through levels of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). Increased tissue O₂⁻ and H₂O₂ generation was greater in samples containing PVAT, indicating that this tissue participates in the generation of these ROS. The absence of IL-6, only in MAB samples containing PVAT, was able to partially prevent the increase the levels of O₂⁻ and TBARS, and totally prevent the increase in H₂O₂ levels, indicating that IL-6 participates in the generation of these molecules. In addition, absence of IL-6 prevented the increase in plasma levels of TBARS. Regarding the antioxidant molecules, ethanol promoted an increase in SOD activity in samples containing PVAT and this response was prevented by the absence of IL-6. No significant differences were observed on the catalase enzyme activity. Based on such results, we demonstrated that IL-6 participates, in a PVAT-dependent manner, in the increase in oxidative stress induced by chronic ethanol consumption. Additionally, we first show that IL-6 is involved in the initial increase in blood pressure induced by chronic ethanol consumption.

Key words: Ethanol; IL-6; oxidative stress; perivascular adipose tissue (PVAT), blood pressure.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema de tratamento com etanol	23
Figura 2	Dosagem sanguínea de etanol	29
Figura 3	Efeito do consumo crônico de etanol sobre os níveis plasmáticos e teciduais de IL-6	30
Figura 4	Efeito do consumo crônico de etanol sobre os níveis teciduais de O_2^- e H_2O_2 , e a participação da IL-6 nessa resposta	31
Figura 5	Efeito do consumo crônico de etanol sobre os níveis teciduais de TBARS e NO_x , e a participação da IL-6 nessa resposta	32
Figura 6	Efeito do consumo crônico de etanol sobre os níveis plasmáticos de TBARS e NO_x , e a participação da IL-6 nessa resposta	33
Figura 7	Efeito do consumo crônico de etanol sobre a atividade tecidual de SOD e catalase, e a participação da IL-6 nessa resposta	34
Figura 8	Efeito do consumo crônico de etanol sobre a atividade plasmática de SOD e catalase, e a participação da IL-6 nessa resposta	35
Figura 9	Efeito do consumo crônico de etanol sobre a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), e a participação da IL-6 nessa resposta	36
Figura 10	Efeito do consumo crônico de etanol sobre a pressão arterial sistólica, e a participação da IL-6 nessa resposta	37

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	13
2.	JUSTIFICATIVA	21
3.	OBJETIVOS	22
3.1.	Objetivo geral	22
3.2.	Objetivos específicos	22
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1.	Grupos experimentais	23
4.2.	Determinação dos níveis sanguíneos de etanol	23
4.3.	Determinação dos níveis plasmáticos e teciduais de IL-6	24
4.4.	Avaliação da formação de espécies reativas de oxigênio (ERO)	24
4.4.1.	Determinação dos níveis plasmáticos e teciduais de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	24
4.4.2.	Determinação da geração tecidual de ânion superóxido (O_2^-)	25
4.4.3.	Determinação dos níveis teciduais de H_2O_2	25
4.4.4.	Determinação dos níveis plasmáticos e teciduais de nitrato/nitrito (NO_x)	26
4.5.	Avaliação dos componentes da maquinaria antioxidante	26
4.5.1.	Avaliação da atividade plasmática e tecidual da enzima superóxido dismutase (SOD)	26
4.5.2.	Avaliação da atividade plasmática e tecidual da enzima catalase	26
4.6.	Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO)	27
4.7.	Avaliação da pressão arterial sistólica	27
4.8.	Análise estatística	27
5.	RESULTADOS	29
5.1.	Avaliação dos níveis sanguíneos de etanol	29

5.2.	Avaliação dos níveis plasmáticos e teciduais de IL-6	29
5.3.	Avaliação dos níveis teciduais de O_2^- e H_2O_2	30
5.4.	Avaliação dos níveis teciduais de TBARS e NO_x	31
5.5.	Avaliação dos níveis plasmáticos de TBARS e NO_x	32
5.6.	Avaliação da atividade tecidual de SOD e catalase	33
5.7.	Avaliação da atividade plasmática de SOD e catalase	34
5.8.	Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO)	35
5.9.	Avaliação da pressão arterial sistólica	36
6.	DISCUSSÃO	38
7.	CONCLUSÕES	47
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

1. INTRODUÇÃO

O consumo de substâncias psicoativas é um fenômeno frequente na população mundial (Ilhan & Yapar, 2020). O etanol está entre estas substâncias, sendo a mais consumida em todo o mundo. Segundo a Organização Mundial da Saúde, aproximadamente 2 bilhões de pessoas em todo o mundo consomem etanol (43% da população mundial com mais de 15 anos). A população brasileira é a terceira maior consumidora de etanol das Américas em litros de álcool puro per capita, e projeta-se que este consumo apresente aumento até 2025 (OMS, 2018). Em avaliação do padrão de consumo de etanol na população brasileira, constatou-se que 19,4% da população acima de 15 anos relatou episódios de consumo abusivo de etanol (5 ou mais doses*) no último mês, média superior à observada na população mundial (18,2%) (CISA, 2020). [*uma dose equivale a 14 gramas de etanol (MacMahon, 1987), que no contexto brasileiro corresponde a 340 mL de cerveja ou 40 mL de vodca (SENAD, 2011)].

O conceito de alcoolismo surge pela primeira vez ainda no século XVIII com o crescimento da produção e comercialização de bebidas alcoólicas após a revolução industrial. Magnus Huss, em seu trabalho intitulado “*Alcoholismus Chronicus*” (1849), é pioneiro na definição do alcoolismo como conjunto de manifestações patológicas do sistema nervoso, nas esferas psíquica, sensitiva e motora. O alcoolismo foi incorporado pela Organização Mundial da Saúde na Classificação Internacional de Doenças (CID), que define o quadro como um conjunto de fenômenos comportamentais, cognitivos e fisiológicos que se desenvolvem após o uso repetitivo de álcool (CISA, 2021).

O consumo de etanol tem ações complexas que podem resultar em alterações de diversos sistemas fisiológicos. Vários mecanismos foram propostos para explicar os efeitos prejudiciais do etanol em diferentes tecidos, mas dentre esses destaca-se o aumento do estresse oxidativo induzido por essa substância (Ceron *et al.*, 2014). O estresse oxidativo é caracterizado pelo comprometimento da sinalização e desequilíbrio das reações de oxidação e redução, uma vez que as ERO modulam vias de sinalização celulares específicas (“sinalização redox”), levando a mudanças na transcrição de genes e síntese proteica com consequente alteração da função celular (Lushchak & Storey, 2021).

Dentre as principais ERO produzidas, o ânion superóxido (O_2^-) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) são particularmente importantes, pois ativam diferentes vias intracelulares de sinalização, levando a respostas celulares que estão envolvidas na fisiopatologia de diferentes doenças. Diversos sistemas enzimáticos, em constante interação, são capazes de transferir elétrons do oxigênio molecular para a produção de O_2^- . Dentre eles é possível citar, como exemplo, as xantinas oxidases, lipoxigenases, ciclooxigenases, algumas enzimas presentes na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, óxido nítrico sintases (NOS) desacopladas e citocromo P450 redutases. Já o complexo enzimático formado pela nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato [NAD(P)H] oxidase tem como única e principal função a produção de ERO, cabendo a esta enzima o papel de principal produtora dessas espécies reativas (Gulcin, 2020; Lushchak & Storey, 2021).

A NAD(P)H oxidase, formada por diferentes subunidades, catalisa a produção de O_2^- pela redução de O_2 usando NADPH ou NADH como doadores de elétron: $2O_2 + NADPH \rightarrow 2O_2^- + NADP^+ + H^+$ (Lushchak & Storey, 2021). A enzima NAD(P)H oxidase protótipo é encontrada em neutrófilos sendo formada pelas subunidades: p47phox (“*phox*” ou “*phagocyteoxidase*” – oxidase fagocítica), p67phox, p40phox, Rac 1 e 2 (proteínas da família Rho de GTPases monoméricas), p22phox e a subunidade catalítica gp91phox (também chamada de Nox2). As subunidades p47phox, p67phox, p40phox e Rac estão localizadas no citoplasma enquanto as subunidades gp91phox e p22phox estão localizadas na membrana, onde elas ocorrem na forma de uma flavoproteína heterodimérica, o citocromo b558. O mecanismo de ativação da NAD(P)H oxidase é complexo e ainda não totalmente elucidado, sendo de crucial importância a ocorrência dos seguintes processos: 1) Fosforilação da subunidade p47phox em múltiplos sítios de serina (Ser303-Ser379); 2) Ativação via Rac1/2, processos estes que culminam na migração das subunidades citoplasmáticas até a membrana, onde se associam ao citocromo b558 para formar a enzima ativa (Vermot *et al.*, 2021). A subunidade p47phox possui diversos sítios de fosforilação para a proteína quinase C (PKC), podendo ser diretamente fosforilada, o que induz alteração conformacional, resultando no aparecimento de um sítio de ligação pelo qual ocorre a interação com o citocromo (Vermot *et al.*, 2021).

Embora as NAD(P)H oxidases tenham sido originalmente descritas como enzimas expressas em células fagocíticas envolvidas na defesa do hospedeiro e imunidade inata, a descoberta de homólogos da gp91phox indicou a existência de uma família de NAD(P)H oxidases, e desde então um enorme progresso tem sido feito em busca do entendimento do papel fisiológico/fisiopatológico destas proteínas. Os novos homólogos, juntamente com a gp91phox, são designados como a família NOX das NAD(P)H oxidases e compreendem sete membros, caracterizados pela subunidade catalítica que utilizam. Compreendem a Nox1, Nox2 (gp91phox), Nox3, Nox4 (originalmente chamada Renox – *renal oxidase* – oxidase renal), Nox5 e Duox1 e Duox2 (Vermot *et al.*, 2021). São expressas em diferentes tecidos onde desempenham ações biológicas diversificadas, e destas, a Nox1, Nox2, Nox4 e Nox5 também contribuem para o desenvolvimento de doenças.

A importância fisiopatológica das ERO e da enzima NAD(P)H oxidase levou muitos pesquisadores a investigar a participação dessa enzima nos efeitos teciduais induzidos pelo consumo de etanol. Nesse sentido, foi descrito que o consumo crônico de etanol induz aumento da geração de ERO tecidual e que essa resposta está associada ao aumento da lipoperoxidação e alteração da função tecidual (Husain *et al.*, 2007; Simplicio *et al.*, 2017a; Do Vale *et al.*, 2017). Além disso, há evidências de que o consumo crônico de etanol induz aumento da expressão de diferentes subunidades da enzima NADPH oxidase, além de induzir aumento de sua atividade (Marchi *et al.*, 2016; Do Vale *et al.*, 2017; Simplicio *et al.*, 2017a). A alteração da expressão/atividade da NAD(P)H oxidase induzida pelo etanol é responsável por alteração da função celular e tecidual levando, por exemplo, à disfunção vascular, aumento da pressão arterial, disfunção renal e erétil (Simplicio *et al.*, 2017a; Do Vale *et al.*, 2017; Leite *et al.*, 2017).

Há anos sabe-se que a interleucina (IL)-6 é produzida por uma ampla variedade de tipos celulares, tais como macrófagos, linfócitos, fibroblastos, células endoteliais, células do músculo liso vascular e adipócitos (Fried *et al.*, 1998; Heinrich *et al.*, 1990; Yudkin *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2001). Sua produção é regulada em resposta a processos inflamatórios, aumento dos níveis de angiotensina II (ANG II), estresse oxidativo e lesões vasculares (Matusik *et al.*, 2012; Garbers *et al.*, 2018). A IL-6 está envolvida no processo inflamatório e é considerada, na clínica,

como biomarcador de doenças cardiovasculares, uma vez que a inflamação vascular está associada ao aumento tecidual dessa citocina (Matusik *et al.*, 2012).

A via de sinalização clássica pela qual a IL-6 ativa suas células alvo, é por meio da ligação a subunidade α do receptor para esta citocina presente na superfície celular (IL-6R α), formando um complexo IL-6·IL-6R α , que tem baixa afinidade. Ocorre, então, a ligação deste com a subunidade β da gp130, levando a formação de um complexo de alta afinidade (IL-6·IL-R α ·gp130). Alguns tipos celulares não expressam o receptor para IL-6 em sua superfície celular, no entanto, todas as células do organismo humano apresentam o gp130 em sua membrana. Esse fato é de extrema importância, pois faz com que todas as células do organismo humano sejam responsivas à IL-6. Isso acontece devido à existência de um receptor solúvel para a citocina (sIL-6R). Dessa forma, a IL-6 pode se ligar a esse receptor solúvel, formando um complexo IL-6·sIL-6R, que se liga então à estrutura gp130 transmembrana das células, fenômeno denominado trans-sinalização (Garbers *et al.*, 2018). A ativação da gp130 na membrana celular ativa uma cascata de sinalização intracelular que leva à fosforilação da tirosina STAT3 que, por sua vez, se transloca para o núcleo atuando na transcrição de genes alvo (Garbers *et al.*, 2018).

As respostas induzidas pela IL-6 através da cascata de sinalização supracitada estão envolvidas em diversos processos fisiopatológicos, nos quais o contexto vascular se destaca. Nesse sentido, estudos da literatura demonstram que a IL-6 pode estimular a expressão de moléculas de adesão, como as moléculas de adesão intracelular e vascular (ICAM-1 e VCAM-1, respectivamente), pelas células endoteliais, aumentando assim a aderência de células imunes e o consequente extravasamento através da parede vascular (Watson *et al.*, 1996; Wung *et al.*, 2005a). Ainda, Wung e colaboradores (2005b) observaram que a IL-6 induz aumento da expressão de ICAM-1 em células endoteliais por mecanismo que envolve aumento do estresse oxidativo e que é dependente da via da STAT3. O aumento da expressão de moléculas de adesão induzido pela IL-6 parece desempenhar papel fundamental na fase inicial do processo inflamatório vascular, que é caracterizada pela infiltração de linfócitos, principalmente neutrófilos (Hurst *et al.*, 2001).

A IL-6 é capaz de promover aumento da expressão do receptor AT₁, responsável pelas reações celulares induzidas pela ANG II (Wassmann *et al.*, 2004). Uma das ações induzidas pela ativação dos receptores AT₁ pela ANG II é o aumento da geração de ERO, especialmente de O₂⁻, em uma resposta que envolve o aumento da expressão da enzima NADPH oxidase (Han *et al.*, 1999; Wassmann *et al.*, 2004; Schrader *et al.*, 2007; Luther & Brown, 2011; Didion, 2017). O aumento da geração vascular de O₂⁻ é um fator determinante para transcrição de IL-6 dependente da ativação do fator nuclear kappa B (NF-κB) (Han *et al.*, 1999). Dessa forma, a ANG II induz aumento dos níveis vasculares de O₂⁻, que, por sua vez, induz aumento da transcrição de IL-6. Esta última promove o aumento da expressão dos receptores AT₁, potencializando os efeitos da ANG II. Esse conjunto de respostas gera um círculo vicioso caracterizado por níveis elevados de IL-6 e aumento do quadro de estresse oxidativo (Didion, 2017). Nesse contexto, o consumo de etanol, que figura na literatura como um dos estímulos causadores de inflamação e disfunção vascular, atua elevando a geração vascular de ERO via enzima NADPH oxidase (Passaglia *et al.*, 2015; Marchi *et al.*, 2016). Ainda, Passaglia *et al.* (2015) demonstraram que o tratamento com losartan, um antagonista seletivo dos receptores AT₁, preveniu o aumento do estresse oxidativo no tecido aórtico e no plasma induzido pelo consumo de etanol, indicando a participação da ANG II nessas respostas. Esse conjunto de efeitos danosos à vasculatura leva à disfunção vascular e, como uma de suas consequências, ao aumento da pressão arterial induzida pelo consumo de etanol, resposta que foi observada em diversos modelos experimentais (Tirapelli *et al.*, 2007; Tirapelli *et al.*, 2007; Passaglia *et al.*, 2015; Marchi *et al.*, 2016; Simplicio *et al.*, 2017a; Simplicio *et al.*, 2017b; Do Vale *et al.*, 2018).

A associação entre a IL-6 e o quadro hipertensivo foi observada pela primeira vez em 2001, quando Chae *et al.* observaram uma correlação linear entre os níveis plasmáticos de IL-6 e o aumento progressivo da pressão arterial de indivíduos saudáveis. A partir dessa observação, diversos estudos foram realizados com o objetivo de elucidar melhor os meios pelos quais a IL-6 interfere nas alterações da pressão arterial. Nesse cenário, diversos trabalhos da literatura demonstraram que a infusão de IL-6 ou a deficiência dessa citocina, isoladamente, não promovem alterações nos níveis pressóricos basais em modelos experimentais (Meléndez *et al.*, 2010; Brands *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2012; González *et al.* 2015; Manhiani *et al.*,

2015). No entanto, apesar dessa ausência de resposta sobre os níveis pressóricos basais, a IL-6 parece participar da resposta de aumento da pressão arterial quando este é induzido por outros estímulos, como por exemplo pela infusão de ANG II (Coles *et al.*, 2007; Brands *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2012).

A inflamação vascular causada pelo etanol e/ou pela IL-6 pode envolver, ainda, a participação do tecido adiposo perivascular (*perivascular adipose tissue* - PVAT), uma estrutura de suporte e armazenamento lipídico que possui propriedades secretórias. Esse tecido atua de forma autócrina, parácrina e/ou endócrina liberando substâncias com propriedades vasoativas que desempenham importante função na regulação do tônus vascular (Szasz & Webb, 2012; Boydens *et al.*, 2012; Cheng *et al.*, 2018). À exceção dos vasos da circulação cerebral, todos os vasos sanguíneos sistêmicos são envolvidos pelo PVAT, que está localizado externamente à camada adventícia (Szasz & Webb, 2012).

O PVAT é um tecido complexo formado por diferentes tipos celulares, com predomínio da presença de adipócitos que podem ser brancos, bege ou marrons, sendo que a predominância de um ou outro tipo de adipócito depende do território vascular. Esses três tipos de adipócitos compartilham algumas características como, por exemplo, o fato de receberem inervação do sistema nervoso simpático (Berthoud *et al.*, 2006). No entanto, várias diferenças estruturais e funcionais existem entre os adipócitos. O tecido adiposo marrom (*brown adipose tissue* – BAT) é composto por adipócitos que tem grande quantidade de mitocôndrias. Essa organela contém ferro, elemento químico responsável pela coloração marrom desses adipócitos, que são metabolicamente ativos e possuem como função principal a termogênese. O BAT é mais vascularizado, innervado e metabolicamente ativo que o tecido adiposo branco (*white adipose tissue* – WAT). Os adipócitos marrons expressam em suas mitocôndrias a proteína UCP1 (*uncoupling protein 1*), que é utilizada para identificação e caracterização desse tecido (Szasz & Webb, 2012; Cheng *et al.*, 2018). O WAT tem como principal função o armazenamento de lipídeos como colesterol e triglicerídeos, mas possuem ainda função metabólica, uma vez que secretam várias adipocinas, como a resistina, adiponectina e leptina, e citocinas, como a IL-6. Além disso, o WAT possui quantidade reduzida de mitocôndrias e não expressa a UCP1. Esses adipócitos são compostos por uma única vesícula lipídica grande, enquanto os adipócitos do

BAT contêm vesículas lipídicas multiloculares menores. A quantidade de WAT em cada depósito de tecido adiposo é variável, mas destaca-se no PVAT do LAM, sendo seu principal constituinte (Anthony *et al.*, 2019). O adipócito bege possui número menor de mitocôndrias e de gotículas de gordura quando comparado ao BAT. Expressa a UCP1, mas sua função não é bem caracterizada. São formados a partir do WAT por um processo denominado *browning* que pode ser estimulado por processos inflamatórios e hormônios incluindo a adrenalina e angiotensina II (Szasz e Webb, 2012; Cheng *et al.*, 2018). O adipócito é o principal constituinte do PVAT, mas esse tecido também contém constitutivamente células do sistema imunológico incluindo células dendríticas, linfócitos T e macrófagos (Wei *et al.*, 2014; Schenkel *et al.*, 2014; Ensan *et al.*, 2016), cuja atividade torna-se relevante em situações fisiopatológicas.

A ação modulatória do PVAT sobre o tônus vascular foi demonstrada pela primeira vez em 1991 por Soltis e Cassis. O efeito anti-contrátil do PVAT foi posteriormente descrito em aortas de ratos em relação à contração induzida pela fenilefrina, serotonina e angiotensina II (Lohn *et al.*, 2002). Atualmente sabe-se que o PVAT produz vários fatores que são responsáveis por sua ação anti-contrátil em diferentes territórios vasculares. Dentre esses fatores vasoativos liberados pelo PVAT estão o óxido nítrico (NO), sulfeto de hidrogênio (H₂S), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), adipocinas (ex. adiponectina, leptina e resistina), prostaciclina (PGI₂), metil palmitato (PAME) e a angiotensina (1–7). Em conjunto, essas moléculas induzem relaxamento vascular e, por esse motivo, estão diretamente relacionadas à ação anti-contrátil do PVAT em diferentes vasos. Além disso, o PVAT produz fatores de contração que incluem noradrenalina, as espécies reativas de oxigênio (ERO), IL-6, fator de necrose tumoral (TNF)- α e quemerina (Szasz e Webb, 2012; Cheng *et al.*, 2018). O PVAT expressa diversas proteínas que regulam a produção e eliminação desses fatores contráteis e relaxantes como a enzima NAD(P)H oxidase, eNOS, ciclooxigenase (COX)1 e COX2, e as isoformas da enzima superóxido dismutase (SOD) (Rajshaker *et al.*, 2010; Szasz e Webb, 2012; Lee *et al.*, 2014; Ayala-Lopez *et al.*, 2014).

O PVAT é reconhecido como uma importante fonte de adipocinas e citocinas pró-inflamatórias, incluindo a IL-6. Condições fisiopatológicas, como o aumento dos níveis de ANG II ou de fatores pró-ateroscleróticos induzem aumento da diferenciação de adipócitos no PVAT, e essa resposta está associada à maior liberação de citocinas pró-inflamatórias, como a

IL-6 (Skurk *et al.*, 2004; Iwai *et al.*, 2009). Além disso, modelos de lesão vascular induziram aumento de IL-6 e outras citocinas pró-inflamatórias no PVAT (Takaoka *et al.*, 2010). Para investigar o papel da IL-6 nesse cenário, utilizamos o leito arterial mesentérico, que tem seu PVAT composto majoritariamente por WAT, um importante secretor dessa citocina (Anthony *et al.*, 2019).

Dessa forma, a hipótese do nosso trabalho foi a de que o consumo crônico de etanol promoveria um aumento da IL-6 que, por sua vez, modularia os efeitos deletérios relacionados ao estresse oxidativo na vasculatura, e que o PVAT poderia participar dessa resposta por ser uma importante fonte de IL-6. Além disso, a ausência da IL-6 preveniria os processos inflamatórios vasculares iniciais, bem como o aumento do estresse oxidativo, inibindo assim o aumento da pressão arterial sistólica.

2. JUSTIFICATIVA

Diversos estudos da literatura demonstram que o PVAT é uma importante fonte de adipocinas e citocinas pró-inflamatórias, incluindo a IL-6. Sabe-se também que condições fisiopatológicas, como o aumento dos níveis de ANG II ou de fatores pró-ateroscleróticos induzem aumento da diferenciação de adipócitos no PVAT, e essa resposta está associada à maior liberação de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6 (Skurk *et al.*, 2004; Iwai *et al.*, 2009). Além disso, modelos de lesão vascular induziram aumento de IL-6 e outras citocinas pró-inflamatórias no PVAT (Takaoka *et al.*, 2010). No entanto, ainda não há na literatura estudos que demonstrem os efeitos da IL-6 sobre a produção de ERO na vasculatura de animais tratados cronicamente com etanol ou ainda a participação do PVAT nessas respostas. Diante do exposto, e considerando a relação entre o consumo de bebidas alcoólicas – tão prevalente na população mundial – e o desenvolvimento de doenças vasculares, a realização do presente estudo torna-se de extrema importância.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

O objetivo do presente estudo foi avaliar o papel da IL-6 na indução do dano oxidativo vascular promovido pelo consumo crônico de etanol.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar a participação da IL-6 no aumento da geração de ERO induzido pelo consumo crônico de etanol;
- Avaliar a participação da IL-6 no aumento da pressão arterial induzido pelo consumo crônico de etanol;
- Avaliar a participação da IL-6 nas alterações dos componentes da defesa antioxidante induzidas pelo consumo crônico de etanol;
- Avaliar a participação do PVAT na produção de IL-6 após o consumo crônico de etanol.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Grupos experimentais

Foram utilizados camundongos machos C57BL/6 e nocautes para IL-6 (IL-6^{-/-}) adultos (20-25 g). Os animais foram divididos em quatro grupos: 1) Controle C57BL/6 (*wild type*, WT) e 2) IL-6^{-/-} (nocautes para IL-6), receberam água *ad libitum*; 3) Etanol WT e 4) Etanol IL-6^{-/-}: tiveram livre acesso exclusivamente à uma solução de etanol 20% (vol./vol.). Os animais dos grupos etanol foram condicionados a um breve período de adaptação que consistiu no fornecimento de etanol em concentrações crescentes semanais de 5 e 10%. Entre a 3^a e 12^a semanas os animais tiveram acesso a uma solução de etanol 20% (Figura 1, Yeligar *et al.*, 2012; Simplicio *et al.*, 2017a; Nakashima *et al.*, 2019). Ao final das 12 semanas os animais foram anestesiados com uretana (1,25 g/kg, i.p.) e foi realizada exsanguinação seguida de rompimento do diafragma. O leito arterial mesentérico [LAM] com ou sem PVAT e sangue foram coletados para realização dos ensaios bioquímicos.

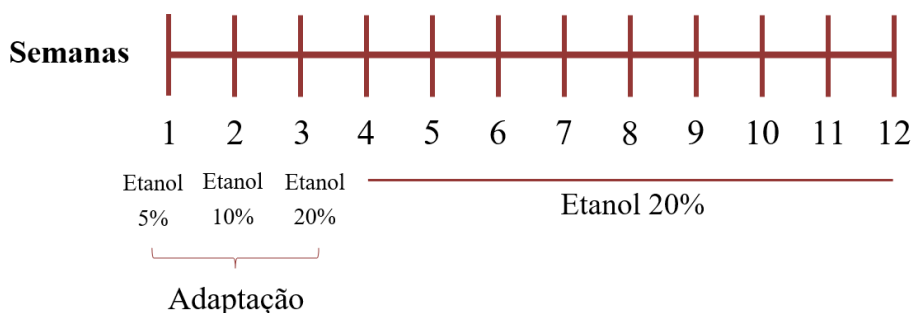


Figura 1. Esquema de tratamento com etanol. Os animais do grupo etanol passaram por um período de adaptação de 2 semanas que consistiu no fornecimento de etanol em concentrações crescentes de 5 e 10% (vol./vol.). Em seguida os animais tiveram acesso à solução de etanol 20% (Simplicio *et al.*, 2017a; Nakashima *et al.*, 2019). A participação da IL-6 nas alterações do estado redox vascular foi avaliada com o uso de animais nocautes para IL-6^{-/-}.

4.2. Determinação dos níveis sanguíneos de etanol

As amostras de sangue coletadas foram acondicionadas em tubos contendo fluoreto de sódio (1 mg/mL de sangue). Em seguida, as amostras foram transferidas para frascos contendo NaCl (1 mg/mL de sangue) e água (1 mL/mL de sangue). Uma curva padrão de calibração foi

utilizada com concentrações conhecidas de etanol (0,02 – 20 g/L) adicionadas ao sangue dos animais controle. A análise da concentração de etanol das amostras e curva padrão foi realizada no cromatógrafo gasoso Varian CP3380 (Varian, CA, EUA) equipado com detector de ionização de chama e coluna capilar de sílica fundida Carbowax (30 m x 0,25 mm I.D., espessura 0,25 µm) (Chrompack, São Paulo, SP, Brasil). Os resultados foram expressos em g de etanol/L de sangue (Gonzaga *et al.*, 2015).

Objetivo: Avaliar as concentrações sanguíneas de etanol após as 12 semanas de consumo crônico.

4.3. Determinação dos níveis plasmáticos e teciduais de IL-6

O tecido (LAM ou LAM com PVAT) foi homogeneizado em tampão salina fosfato (PBS, pH 7,4) e em seguida centrifugado (10000 x g, 15 min, 4°C). O sangue foi coletado em tubos contendo EDTA e centrifugado (1000 x g, 10 min, 4°C). Foram utilizados 100 µL do sobrenadante das amostras para o ensaio de ELISA (Enzyme Linked Immunono Sorbent Assay) para a avaliação de IL-6 (#431304– ELISA MAX™ Deluxe Sets Biolegend, San Diego, CA, EUA). Os resultados foram representados como pg/mg de proteína para o tecido e pg/mL para o plasma. Em todos os ensaios, o conteúdo proteico das amostras foi analisado pelo método de Lowry (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA).

Objetivo: Avaliar a participação do consumo crônico de etanol nas concentrações plasmáticas e teciduais da IL-6.

4.4. Avaliação da formação de espécies reativas de oxigênio (ERO)

Objetivo: Avaliar a participação da IL-6 nas alterações dos níveis de ERO teciduais e plasmáticos induzidas pelo consumo crônico de etanol.

4.4.1. Determinação dos níveis plasmáticos e teciduais de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

O sangue foi coletado com seringas heparinizadas e em seguida centrifugado (1.000 x g, 10 min, 4°C). O tecido (LAM e LAM com PVAT) foi removido e armazenado a -80°C até o momento do experimento. A determinação da concentração de TBARS foi realizada por teste colorimétrico, seguindo recomendações de kit comercial (#10009055, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EUA). Os resultados foram representados como nmol/mg de proteína para o tecido e nmol/mL para o plasma.

4.4.2. Determinação da geração tecidual de ânion superóxido O_2^-

O tecido (LAM ou LAM com PVAT) foi homogeneizado em tampão fosfato pH 7,4 (20 mmol/L de KH_2PO_4 , 1 mmol/L de EGTA e 150 mmol/L de sacarose). A reação foi iniciada pela adição de NADPH (0,1 mmol/L) a uma suspensão (com volume final de 250 μ L) contendo amostra (50 μ L), lucigenina (5 μ mol/L) e tampão fosfato pH 7,4. Os valores foram obtidos a partir da subtração do valor basal (obtido pela medida da amostra, tampão fosfato mais lucigenina) pelo valor obtido após adição de NADPH. Foram realizados 30 ciclos de leitura em um luminômetro Orion II (Berthold detection systems, Pforzheim, Alemanha). Os resultados foram normalizados pela concentração proteica de cada amostra e expressos como URL (unidades relativa de luz)/mg de proteína.

4.4.3. Determinação dos níveis teciduais de H_2O_2

O tecido (LAM ou LAM com PVAT) dos animais foi homogeneizado em solução de Krebs (mM): NaCl 130; KCl 4,7; KH_2PO_4 1,18; $MgSO_4$ 1,17; $NaHCO_3$ 14,9; Glicose 5,5; $CaCl_2$ 1,6; pH 7,4). O homogenato obtido foi centrifugado a 10.000 x g, 4 °C por 5 min. Em seguida, o H_2O_2 foi avaliado utilizando o reagente Amplex® Red (10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine) (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, EUA - A22188). Para a montagem da placa, a cada 50 μ l do sobrenadante obtido foram adicionados 50 μ l de *working solution* formado basicamente pelo reagente Amplex® Red (10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine) e a peroxidase horseradish (HRP). O reagente, na presença da HRP reage com o H_2O_2 , produzindo a resorufina, produto altamente fluorescente (λ excitação 571

nm, λemissão 585 nm). Uma curva padrão de H₂O₂ foi construída e os valores de concentração obtidos foram expressos em nmol/mg proteína.

4.4.4. Determinação dos níveis plasmáticos e teciduais de nitrato/nitrito (NO_x)

O tecido (LAM ou LAM com PVAT) foi homogeneizado em PBS pH 7,4 e o homogenato centrifugado (10.000 x g, 4°C, 20 min). Em seguida, 500 µL do sobrenadante obtido foi ultrafiltrado (Amicon Ultra-0.5 mL 30Kda, Millipore), em temperatura ambiente (14.000 x g, 10 min). A determinação dos níveis teciduais de NO_x foi realizada colorimetricamente (540 nm), conforme especificações indicadas pelo fabricante do kit (#780001, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EUA). Os resultados foram expressos em µmol/g proteína.

4.5. Avaliação de componentes da maquinaria antioxidante

Objetivo: Avaliar a participação da IL-6 nas alterações dos níveis de componentes da maquinaria antioxidante teciduais e plasmáticos induzidas pelo consumo crônico de etanol.

4.5.1. Avaliação da atividade plasmática e tecidual da enzima superóxido dismutase (SOD)

O sangue foi coletado e centrifugado a 6.500 × g por 15 minutos a 4° C para separação do plasma. O tecido (leito arterial mesentérico) foi homogeneizado em tampão salina fosfato (PBS, pH 7,4) e centrifugado a 4.000 × g, 12 min, 4°C. Foram utilizados 20 uL do sobrenadante durante o ensaio para determinação da atividade da SOD, que foi realizado segundo orientações estabelecidas pelo kit comercial (#19160, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Os resultados foram expressos em % de inibição/mg de proteína.

4.5.2. Avaliação da atividade plasmática e tecidual da catalase

O sangue foi coletado e centrifugado a 6.500 × g por 15 minutos a 4° C para separação do plasma. O tecido (leito arterial mesentérico) foi homogeneizado em 200 µL de tampão PBS

pH 7,4 e foram adicionados 100 μ L de tampão fosfato aos homogenatos, seguido por centrifugação de $9.000 \times g$ por 20 minutos. O ensaio foi realizado pela adição de 20 μ L do sobrenadante da amostra a 980 μ L de solução reação em cubetas de quartzo e, após homogeneização, foi medida a velocidade de decomposição do H_2O_2 . Os resultados foram expressos como unidades de catalase/mg proteína.

4.6. Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO)

A análise da MPO foi efetuada segundo descrito por Simplicio et al. (2017b). Em suma, o tecido (leito arterial mesentérico) foi homogeneizado em tampão gelado (pH 4,7) com a seguinte composição: 0,1 mol/L NaCl, 0,02 mol/L $NaPO_4$, and 0,015 mol/L EDTA. Os homogenatos foram, então, centrifugados a $800 \times g$ por 15 minutos a 4^a C. O precipitado foi suspenso em tampão $NaPO_4$ na concentração de 0,05 mol/L (pH 5,4) contendo 0,5% de hexadeciltribrometo de metilamônia e, então, homogeneizado novamente. O homogenato foi centrifugado a $10.000 \times g$ por 15 minutos a 4^a C. Para o ensaio, foram adicionados 50 μ L do sobrenadante, 25 μ L de tetrametilbenzidina (1,6 mmol/L) e 100 μ L de H_2O_2 (3%). A leitura da reação foi realizada em espectrofotômetro ($\lambda 450$ nm) e o resultado expresso em Δ absorbância (450 nm)/mg de proteína.

4.7. Avaliação da pressão arterial sistólica

A pressão arterial sistólica foi aferida semanalmente por pletismografia de cauda utilizando o pletismógrafo EFF306 (Insight, Brasil). Antes de iniciar o protocolo, os animais passaram por uma adaptação, onde foram realizadas 3 aferições da pressão arterial no período de 3 dias. Após esse período, as medidas foram registradas baseando-se na média de 3 medidas de pressão arterial sistólica. Os resultados estão apresentados em mmHg (Carda et al., 2015).

4.8. Análise estatística

Os resultados foram analisados utilizando a análise de variância de duas vias (*two-way ANOVA*), seguida pelo teste de Bonferroni. As concentrações de etanol no sangue bem como as concentrações plasmáticas de IL-6 foram analisadas por teste t de *Student*. O nível de significância considerado crítico para diferenças significativas entre os grupos foi de 0,05 ($p < 0,05$). Os testes estatísticos foram realizados com o software GraphPad Prism (versão 6.0).

5. RESULTADOS

5.1. Avaliação dos níveis sanguíneos de etanol

Não houve diferença entre as concentrações sanguíneas dos animais (WT ou IL-6^{-/-}) tratados com etanol (Figura 2). Nos animais dos grupos controle (WT ou IL-6^{-/-}), o etanol não foi detectado.

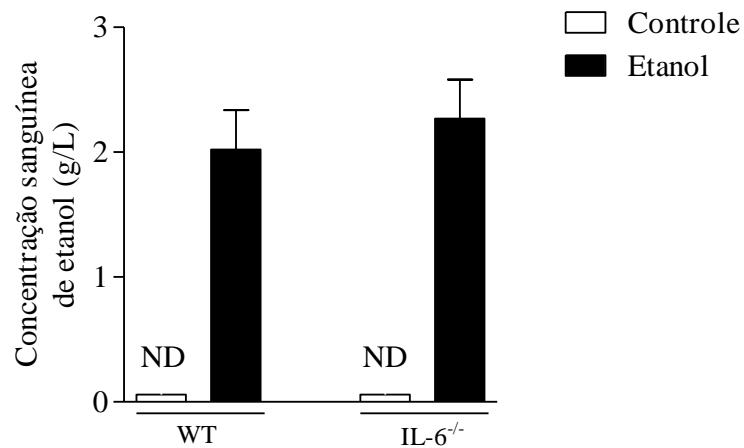


Figura 2. Dosagem sanguínea de etanol. A determinação sanguínea de etanol foi realizada por cromatografia gasosa em animais dos grupos controle, etanol, IL-6^{-/-} e etanol IL-6^{-/-}. Os resultados representam a média \pm EPM (n=5-7). ND: não detectado.

5.2. Avaliação dos níveis plasmáticos e teciduais de IL-6

O consumo crônico de etanol promoveu aumento dos níveis plasmáticos de IL-6 em animais WT (Figura 3A). No tecido de animais WT, as amostras de LAM contendo PVAT apresentaram maiores níveis de IL-6 em relação às amostras na ausência do PVAT. Além disso, o consumo crônico de etanol promoveu aumento dos níveis de IL-6 nas amostras contendo PVAT, mas não nas amostras na ausência desse tecido (Figura 3B).

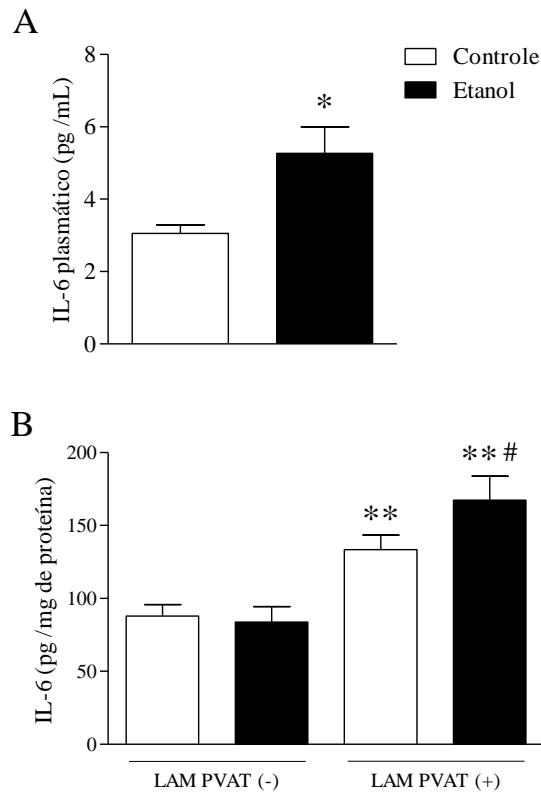


Figura 3. Efeito do consumo crônico de etanol sobre os níveis plasmáticos e teciduais de IL-6. Os níveis plasmáticos (A) e teciduais (B) de IL-6 foram avaliados por ELISA em animais WT. Os resultados representam a média \pm EPM (n=5-7). *Comparado ao grupo controle ($p < 0,05$, teste de t de Student). **Comparado ao controle e etanol sem PVAT; **#Comparado ao controle com PVAT ($p < 0,05$, two-way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni).

5.3. Avaliação dos níveis teciduais de O_2^- e H_2O_2

O consumo crônico de etanol promoveu aumento dos níveis de O_2^- em LAM de camundongos e, na presença do PVAT, foi observado aumento de maior magnitude. Na presença do PVAT as amostras de LAM de animais $IL-6^{-/-}$ tratados com etanol apresentaram aumento de menor proporção quando comparadas às amostras de animais do grupo etanol WT. (Figura 4A). Além disso, o consumo crônico de etanol provocou aumento dos níveis teciduais de H_2O_2 nas amostras contendo PVAT, resposta não observada nos animais nocautes para IL-6 (Figura 4B).

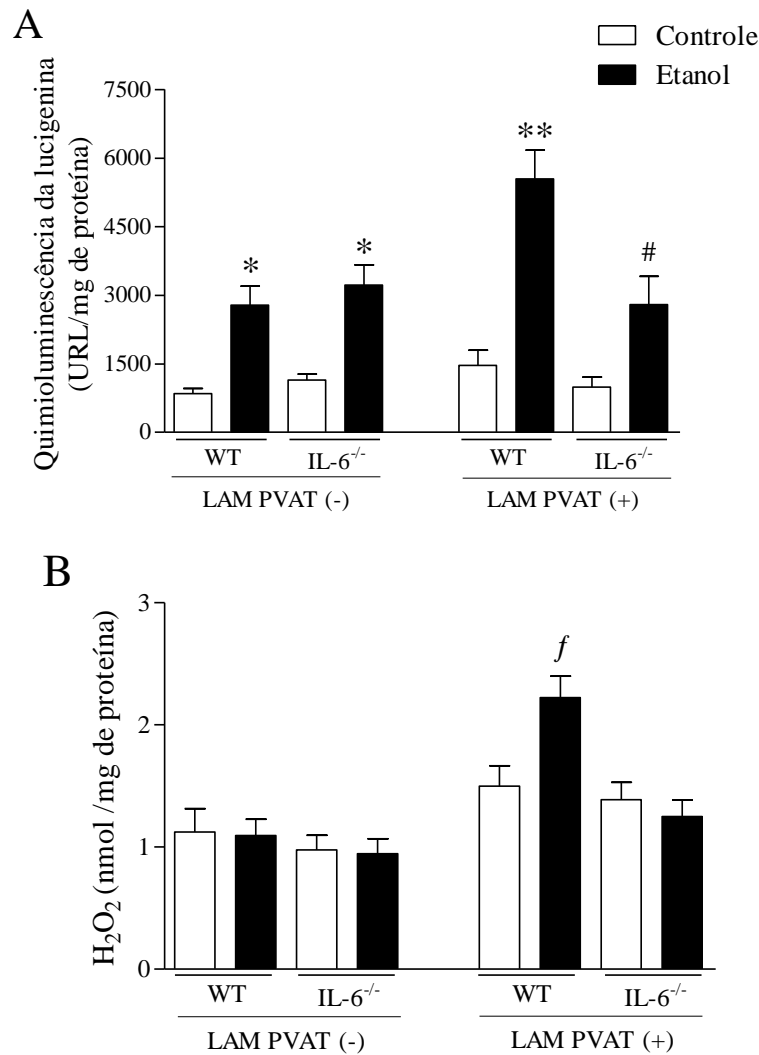


Figura 4. Efeito do consumo crônico de etanol sobre os níveis teciduais de O_2^- e H_2O_2 , e a participação da IL-6 nessa resposta. Os níveis O_2^- de foram avaliados por método de quimioluminescência da lucigenina (A). Os níveis de H_2O_2 foram avaliados por fluorimetria (B). Ambos os testes foram realizados em LAM dos grupos controle, etanol, IL-6^{-/-} e etanol + IL-6^{-/-}, contendo ou não PVAT. Os resultados representam a média \pm EPM (n=5-7). *Comparado aos respectivos grupos controle; **Comparado aos grupos etanol PVAT(-) e etanol IL-6^{-/-} PVAT(-); #Comparado ao grupo etanol PVAT(+); ^fComparado ao restante dos grupos experimentais (p<0,05; two-way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni).

5.4. Avaliação dos níveis teciduais de TBARS e NO_x

O consumo crônico de etanol promoveu aumento dos níveis teciduais de TBARS no LAM de camundongos na ausência ou presença do PVAT. Em animais IL-6^{-/-}, esse aumento foi parcialmente prevenido apenas nas amostras contendo PVAT, indicando que, nesse contexto, a IL-6 participa dessa resposta (Figura 5A). O consumo de etanol ou a utilização de animais nocautes para IL-6 não promoveram alterações significativas nos níveis teciduais de NO_x (Figura 5B).

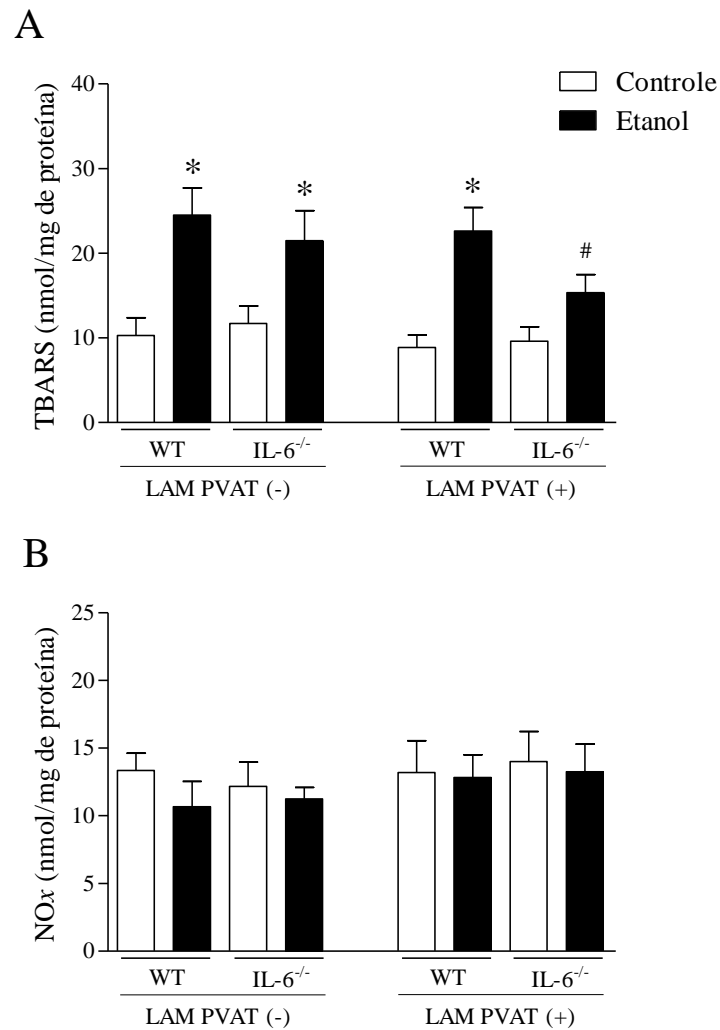


Figura 5. Efeito do consumo crônico de etanol sobre os níveis teciduais de TBARS e NO_x, e a participação da IL-6 nessa resposta. Os níveis teciduais de TBARS (A) e NO_x (B) foram avaliados por método colorimétrico em LAM dos animais controle, etanol, IL-6^{-/-} e etanol + IL-6^{-/-}, contendo ou não PVAT. Os resultados representam a média ± EPM (n=5-7). *Comparado aos respectivos grupos controle; #Comparado ao grupo etanol PVAT (+) (p<0,05; *two-way* ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni).

5.5. Avaliação dos níveis plasmáticos de TBARS e NO_x

O consumo crônico de etanol promoveu aumento dos níveis plasmáticos de TBARS, resposta que não foi observada no grupo IL-6^{-/-}, indicando que essa citocina participa dessa resposta (Figura 6A). No que concerne aos níveis plasmáticos de NO_x, o consumo crônico de etanol não promoveu alterações nos grupos experimentais (Figura 6B).

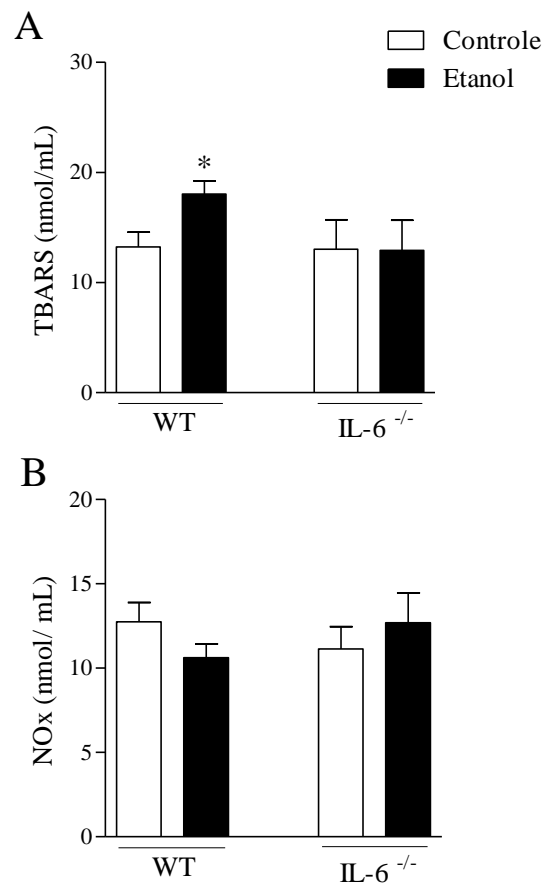


Figura 6. Efeito do consumo crônico de etanol sobre os níveis plasmáticos de TBARS e NO_x, e a participação da IL-6 nessa resposta. Os níveis plasmáticos de TBARS (A) e NO_x (B) foram avaliados por método colorimétrico nos grupos controle, etanol, IL-6^{-/-} e etanol + IL-6^{-/-}. Os resultados representam a média ± EPM (n=5-7). *Comparado aos grupos controle, controle IL-6^{-/-} e etanol IL-6^{-/-} (p<0,05; *two-way* ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni).

5.6. Avaliação da atividade tecidual de SOD e catalase

O consumo crônico de etanol promoveu aumento da atividade da SOD em LAM de camundongos na presença do PVAT, resposta que não foi observada no grupo IL-6^{-/-}, indicando que essa citocina participa dessa resposta (Figura 7A). No que concerne à atividade da catalase, o consumo crônico de etanol e/ou a utilização de animais nocautes para IL-6 não promoveram alterações significativas na atividade tecidual dessa enzima (Figura 7B).

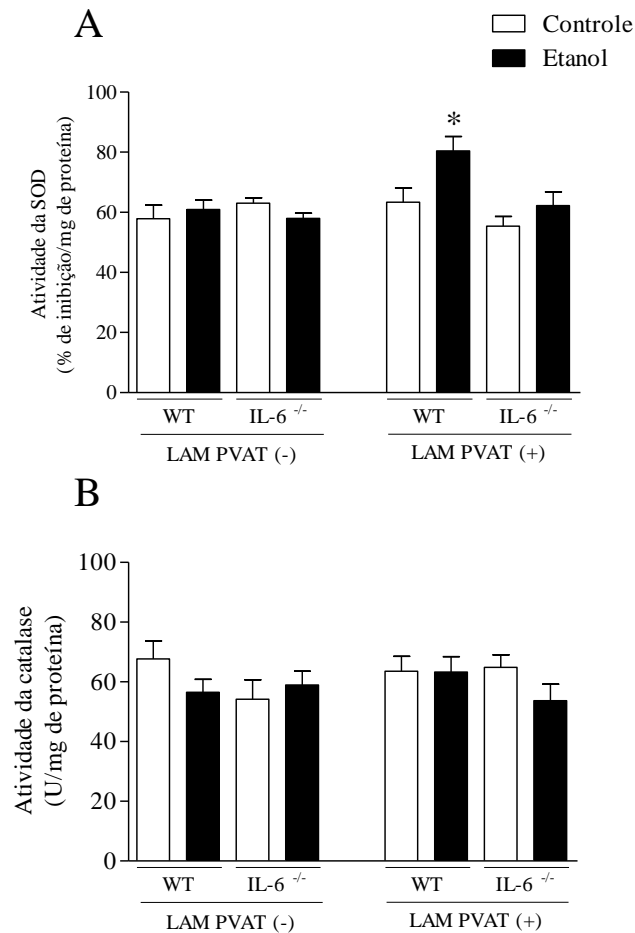


Figura 7. Efeito do consumo crônico de etanol sobre a atividade tecidual de SOD e catalase, e a participação da IL-6 nessa resposta. A atividade tecidual da SOD (A) foi avaliada por método colorimétrico. A atividade da catalase (B) foi avaliada por espectrofotometria. Ambos os ensaios foram realizados em LAM dos animais controle, etanol, IL-6^{-/-} e etanol + IL-6^{-/-}, contendo ou não PVAT. Os resultados representam a média \pm EPM (n=5-7). *Comparado ao restante dos grupos experimentais. (p<0,05; two-way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni).

5.7. Avaliação da atividade plasmática de SOD e catalase

O consumo crônico de etanol e/ou a utilização de animais nocautes para IL-6 não promoveram alterações significativas nas atividades plasmáticas da SOD (Figura 8A) e da catalase (Figura 8B).

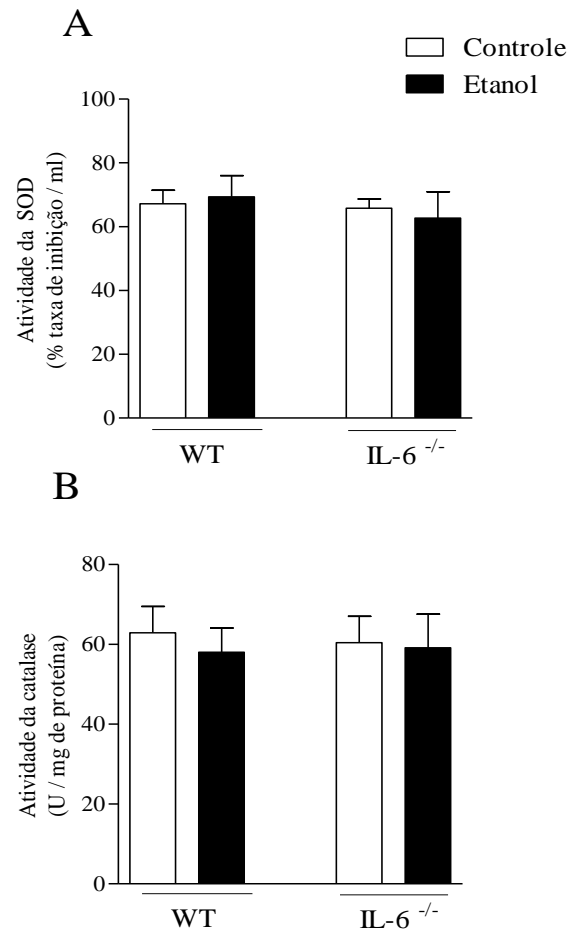


Figura 8. Efeito do consumo crônico de etanol sobre a atividade plasmática da SOD e catalase, e a participação da IL-6 nessa resposta. A atividade tecidual da SOD (A) foi avaliada por método colorimétrico. A atividade da catalase (B) foi avaliada por espectrofotometria. Ambos os ensaios foram realizados nos grupos controle, etanol, IL-6^{-/-} e etanol + IL-6^{-/-}. Os resultados representam a média ± EPM (n=5-7). (p<0,05; two-way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni).

5.8. Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO)

O consumo crônico de etanol provocou aumento na atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) em LAM de camundongos na ausência e presença do PVAT. Em animais IL-6^{-/-}, no entanto, essa resposta não foi observada, indicando que essa citocina participa dessa resposta (Figura 9).

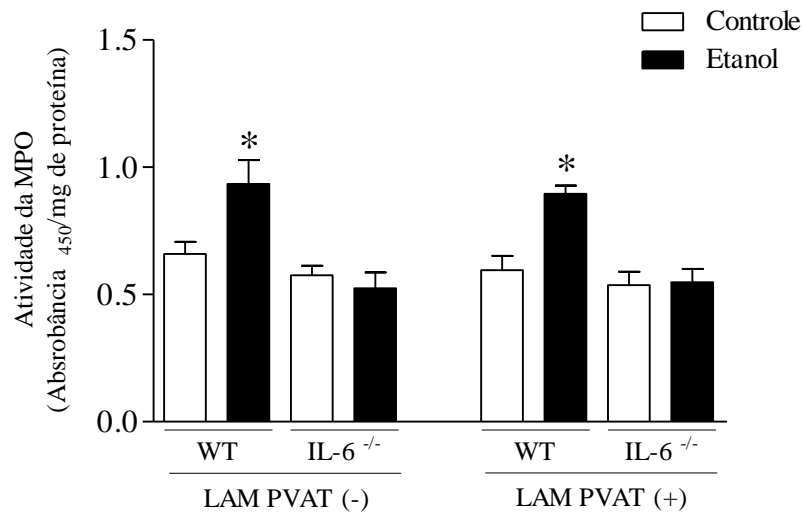


Figura 9. Efeito do consumo crônico de etanol sobre a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), e a participação da IL-6 nessa resposta. A atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) foi avaliada através de espectrofotometria em LAM dos animais controle, etanol, IL-6^{-/-} e etanol + IL-6^{-/-}, contendo ou não PVAT. Os resultados representam a média \pm EPM (n=5-7). *Comparado aos respectivos grupos controle. (p<0,05; two-way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni).

5.9. Avaliação da pressão arterial sistólica

Após 4 semanas, o consumo de etanol promoveu aumento significativo da pressão arterial sistólica em camundongos. Em animais nocautes para IL-6, o aumento da pressão arterial sistólica foi observado somente após a 6^a semana de tratamento com etanol, indicando que essa citocina participa dessa resposta (Figura 10).

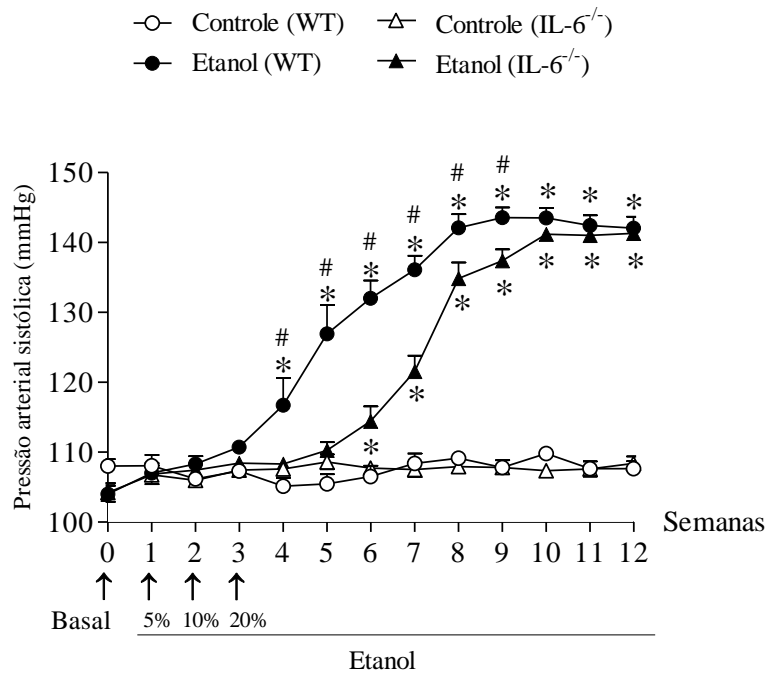


Figura 10. Efeito do consumo crônico de etanol sobre a pressão arterial sistólica, e a participação da IL-6 nessa resposta. A pressão arterial sistólica foi avaliada pelo método não invasivo de pletismografia de cauda nos animais controle, etanol, IL-6^{-/-} e etanol IL-6^{-/-}. Os resultados representam a média ± EPM (n=5-7). *Comparado aos respectivos grupos controle. #Comparado ao grupo etanol IL-6^{-/-}. (p<0,05; two-way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni).

6. DISCUSSÃO

Observamos que os animais submetidos ao consumo crônico de etanol por 12 semanas apresentaram aumento das concentrações plasmáticas de etanol, resposta também observada em animais IL-6^{-/-} submetidos ao mesmo tratamento. Os níveis sanguíneos de etanol encontrados após a realização do protocolo experimental são semelhantes aos de outros estudos da literatura que utilizam o mesmo modelo experimental (Simplicio *et al.*, 2017b; Ceron *et al.*, 2018). A concentração de etanol administrada mimetiza, aproximadamente, quatro doses diárias de álcool para humanos (4g/kg), quantidade considerada como consumo abusivo de bebidas alcoólicas (CISA, 2021). De fato, as concentrações sanguíneas de etanol encontradas em nosso trabalho são semelhantes às observadas em humanos após consumo abusivo de etanol (Urso *et al.*, 1981).

As citocinas inflamatórias são importantes mediadores do dano tecidual induzido pelo consumo crônico de etanol (Simplicio *et al.*, 2017b; Leite *et al.*, 2017). Em nosso estudo, o consumo crônico de etanol promoveu aumento dos níveis de IL-6 em LAM contendo PVAT, mas não em LAM na ausência do PVAT. Observamos também que, independentemente do consumo crônico de etanol, os níveis de IL-6 são maiores em LAM contendo PVAT, quando comparado às amostras na ausência do PVAT, indicando que esse tecido é uma importante fonte de citocinas no LAM. Essa resposta pode ser explicada pelo fato de que o PVAT do LAM, diferente de outros depósitos de tecido adiposo, é composto em sua maioria por adipócitos brancos, que por sua vez apresentam um perfil secretório que favorece a síntese de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6 (Szasz e Webb, 2012; Szasz *et al.*, 2013; Anthony *et al.*, 2019). Nossos achados também demonstraram que o consumo crônico de etanol promoveu aumento dos níveis plasmáticos de IL-6, resultado que corrobora estudos prévios da literatura (Simplicio *et al.*, 2017a; Shirpoor *et al.*, 2013).

Um dos principais mecanismos pelo qual o consumo crônico de etanol causa danos vasculares é pelo aumento na geração de ERO (Ceron *et al.*, 2014; do Vale *et al.*,

2018). Essa resposta é observada em diversos estudos que mostram que o consumo crônico de etanol induz o aumento da produção de O_2^- via NAD(P)H oxidase em diversos tecidos (Polikandriotis *et al.*, 2006; Husain *et al.*, 2011). Após produzido, o O_2^- pode reagir com o óxido nítrico (NO), gerando peroxinitrito ($ONOO^-$) ($O_2^- + NO \rightarrow ONOO^-$), uma molécula de ação oxidante que induz lipoperoxidação e nitração proteica, respostas que podem induzir dano tecidual (Korkmaz *et al.*, 2011; Constantino *et al.*, 2014). Além disso, o O_2^- pode sofrer também ação da enzima superóxido dismutase (SOD), sendo reduzido a H_2O_2 , uma molécula que exerce papel na ativação de mensagens intracelulares secundárias, sendo importante na regulação de respostas fisiológicas e patológicas (Touyz & Briones, 2011; Rodiño-Janeiro *et al.*, 2013, do Vale & Tirapelli, 2019).

No presente estudo, o consumo crônico de etanol promoveu aumento da geração de O_2^- no LAM de camundongos. Em LAM contendo PVAT, a magnitude do aumento dos níveis de O_2^- foi maior quando comparado às amostras de LAM na ausência do PVAT, indicando que o PVAT favorece a geração de O_2^- . Esse resultado corrobora estudos da literatura que demonstram que, de fato, o PVAT é capaz de produzir O_2^- via NAD(P)H oxidase (Gao *et al.*, 2006; Szasz *et al.*, 2013). Os animais IL-6^{-/-} apresentaram prevenção parcial do aumento da geração de O_2^- nas amostras de LAM contendo PVAT, mas não nas amostras de LAM na ausência do PVAT. Essa resposta indica que a IL-6 participa da geração de ERO no PVAT, mas não na vasculatura. O O_2^- detectado pelo método de quimioluminescência da lucigenina é majoritariamente proveniente da enzima NAD(P)H oxidase e, portanto, sugere-se que a participação da IL-6 na geração dessa espécie envolva a maior ativação e/ou expressão da NAD(P)H oxidase. De fato, há na literatura trabalhos que demonstram o papel da IL-6 no aumento da expressão e atividade da NAD(P)H oxidase e no conseqüentemente aumento da geração de ERO em modelos diversos (Rojas *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2016; Robinson *et al.*, 2020).

Observamos que o consumo crônico de etanol promoveu aumento dos níveis de H_2O_2 em LAM contendo PVAT, mas não em LAM na ausência do PVAT. Essa resposta pode ser explicada pelo aumento da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), que é responsável pela conversão de O_2^- em H_2O_2 . A SOD existe, nos mamíferos, em três

isoformas: SOD1 (Cu-Zn-SOD), uma enzima solúvel localizada principalmente no citoplasma; SOD2 (Mn-SOD), localizada principalmente na matriz mitocondrial; e SOD3 (EC-SOD), isoforma que tem como principal característica sua excreção para o meio extracelular. Como conjunto, as isoformas da SOD são consideradas a linha de defesa primária do organismo no combate às ERO devido sua capacidade de realizar a reação supracitada, convertendo O_2^- em H_2O_2 (do Vale & Tirapelli, 2019). Estudos da literatura apresentam uma variância quanto a atividade da SOD durante aumento do estresse oxidativo induzido por consumo crônico de etanol, a depender do tempo de tratamento e do tecido estudado (Husain *et al.*, 2001; Husain *et al.*, 2007). De fato, trabalhos prévios de nosso laboratório observaram que o tratamento com etanol por 12 semanas na mesma dose utilizada no presente estudo promoveu o aumento da atividade da SOD nos tecidos aórtico e renal (Simplicio *et al.*, 2017b; Sousa *et al.*, 2020). Essa resposta pode ser justificada pelo aumento dos níveis de ânion superóxido, que exige maior atividade antioxidante do organismo para redução de sua ação danosa. No que concerne à IL-6, a utilização de animais nocautes para essa citocina, na presença do PVAT, preveniu totalmente o aumento dos níveis teciduais de H_2O_2 e da atividade tecidual da SOD, indicando que essa citocina participa dessas respostas quando induzidas pelo consumo crônico de etanol.

Alternativamente, o aumento dos níveis de H_2O_2 poderia ser resultado da redução da atividade da enzima catalase, responsável pela conversão do H_2O_2 em $H_2O + O_2$. Entretanto, nossos resultados demonstraram que o tratamento com consumo crônico de etanol e/ou a utilização de animais IL-6^{-/-} não promoveram alterações na atividade tecidual da catalase, indicando que essa enzima não participa da resposta de aumento dos níveis de H_2O_2 em LAM de camundongos tratados cronicamente com etanol.

O NO, um radical livre produzido a partir da L-arginina através da ação da enzima NO sintase (NOS) na presença de cofatores, tem ações fisiológicas que promovem a vasodilatação por meio da ativação da guanilato ciclase nas células do músculo liso vascular, além de desempenhar funções protetoras relacionadas à redução da inflamação vascular, agregação plaquetária, entre outros (Förstermann & Münzel, 2006). Estudos da

literatura demonstram que, a depender do tecido estudado e da dosagem e tempo de tratamento com consumo de etanol, há redução da biodisponibilidade do NO, situação que promove efeitos deletérios à vasculatura. No entanto, em nosso estudo, não foram observadas alterações significativas dos níveis plasmáticos e teciduais de NO_x, na ausência ou presença do PVAT, em LAM de camundongos, induzidas pelo consumo crônico de etanol e/ou pela utilização de animais nocautes para IL-6. Essa resposta pode ser explicada por um aumento da expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS). A indução da iNOS provoca o aumento dos níveis de NO corporal e, de fato, o aumento de sua expressão induzida pelo consumo crônico de etanol já foi descrito em estudos prévios de nosso laboratório no tecido renal e no leito arterial mesentérico (Tirapelli *et al.*, 2012, Ceron *et al.*, 2018).

O ONOO⁻ é derivado da reação entre as moléculas de O₂⁻ e NO, e tem ações oxidantes, como a lipoperoxidação, que pode ser prejudicial a diversos tecidos, uma vez que promove alteração da fluidez de membrana (Korkmaz *et al.*, 2011; Constantino *et al.*, 2014). No presente trabalho, o consumo crônico de etanol promoveu aumento dos níveis de TBARS, utilizado como biomarcador da lipoperoxidação, no LAM de camundongos, na presença ou ausência do PVAT. Esse resultado corrobora estudos prévios da literatura que demonstram o aumento dessas espécies induzidas pelo consumo crônico de etanol (Simplicio *et al.*, 2017b). Em amostras de LAM contendo PVAT, os animais IL-6^{-/-} tratados cronicamente com etanol apresentaram aumento dos níveis de TBARS de menor magnitude quando comparados às amostras na ausência do PVAT. De maneira semelhante, o consumo crônico de etanol provocou aumento das concentrações plasmáticas de TBARS, resposta que não foi observada em animais IL-6^{-/-}. Essas respostas indicam que a IL-6 modula a lipoperoxidação plasmática e no PVAT de LAM de camundongos, mas não na vasculatura mesentérica.

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima pertencente à superfamília de heme peroxidases, majoritariamente expressa em leucócitos polimorfonucleares, como neutrófilos e monócitos, e tem papel fundamental na atividade antimicrobiana característica da imunidade inata do organismo humano (Aratani, 2018; Ndrepepa, 2019).

Durante quadros infecciosos, a MPO é deslocada ao fagossomo, no interior dos neutrófilos, onde ela catalisa diversas reações com produtos da enzima NADPH oxidase, também deslocada a essa organela, gerando assim espécies reativas derivadas da MPO, como o ácido hipocloroso (HOCl) e o ácido hipotiocianoso (HOSCN), que são responsáveis por exercer a atividade antimicrobiana característica da enzima (Nussbaum *et al.*, 2013; Frangie & Daher, 2022). O aumento da geração dessas espécies altamente reativas derivadas da MPO e a degranulação de neutrófilos, processos característicos da imunidade inata, estão associados a processos inflamatórios, caracterizados pela infiltração de neutrófilos e monócitos, e ao aumento do estresse oxidativo decorrente desses processos (Nussbaum *et al.*, 2013; Frangie & Daher, 2022).

Em nosso estudo, o consumo crônico de etanol promoveu aumento da atividade da mieloperoxidase em LAM de camundongos, na presença ou ausência do PVAT. Esse resultado corrobora estudos prévios de nosso laboratório que descreveram aumento da atividade dessa enzima induzido pelo consumo crônico de etanol em múltiplos tecidos, como no córtex renal, no ventrículo esquerdo e no corpo cavernoso (Leite *et al.*, 2017; Sousa *et al.*, 2021). Além disso, observamos que não houve aumento da atividade da MPO em tecidos de animais IL-6^{-/-}, indicando que essa citocina participa dessa resposta. De fato, já é conhecido na literatura que a IL-6 atua, no início de processos inflamatórios, controlando a secreção de quimiocinas (como a CXCL5, CXCL6, CCL2 e CCL8) que modulam a expressão de moléculas de adesão intracelulares e vasculares (ICAM-1 e VCAM-1, respectivamente) e, conseqüentemente, promovem a migração de neutrófilos para o sítio de inflamação (Jones, 2005; Jones & Jenkins, 2018). Ainda, a IL-6 também atua promovendo a degranulação de neutrófilos já infiltrados e inibindo a apoptose de células T, processo que caracteriza a transição entre a resposta imune inata e adquirida. A degranulação destes neutrófilos culmina na liberação do conteúdo dessas células, como as espécies reativas derivadas da MPO (Jones, 2005; Jones & Jenkins, 2018). Portanto, a utilização de animais nocautes para IL-6 inibiria os subseqüentes processos relacionados

a migração de neutrófilos ao sítio inflamatório, explicando ausência de alteração da atividade da MPO nesses grupos experimentais.

Por fim, no presente trabalho, observamos o aumento da pressão arterial dos animais tratados cronicamente com etanol. Vários trabalhos demonstraram a relação entre o consumo crônico de etanol e o aumento da pressão arterial, em diferentes modelos animais e diferentes esquemas de tratamentos com consumo de etanol (Tirapelli *et al.*, 2008; Husain *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2015; Passaglia *et al.*, 2015). Como mecanismos propostos para explicar essa associação, o aumento na contratilidade vascular, a estimulação do sistema nervoso simpático (SNS) e o aumento do estresse oxidativo têm destaque na literatura desta temática.

No que concerne à ativação do SNS, diversos estudos demonstraram a capacidade do etanol de promover a hiperatividade desse sistema, caracterizada pelo aumento das concentrações plasmáticas de adrenalina e noradrenalina (Silva *et al.*, 2015; Bomfim *et al.*, 2017). O aumento na atividade do SNS está associado à liberação de renina pelas células justaglomerulares localizadas na artéria aferente renal, promovendo assim a maior atividade do sistema renina angiotensina (SRA) (Kim *et al.*, 2007). A renina é uma enzima que promove a clivagem do angiotensinogênio, seu substrato, formando a angiotensina I (ANG I). Essa, por sua vez, é clivada pela enzima conversora de angiotensina (ECA), formando a angiotensina II (ANG II), que promove, através principalmente da ativação de seu receptor AT₁, diversas respostas biológicas que podem desencadear o aumento da pressão arterial, como a vasoconstrição, aumento da atividade simpática, aumento da secreção de aldosterona, aumento da reabsorção de Na⁺, entre outras (Carey, 2013).

Outra resposta importante induzida pela ativação dos receptores AT₁ pela ANG II é o aumento da produção de ERO pela enzima NADPH oxidase, culminando no aumento do quadro de estresse oxidativo (Touyz & Schiffrin, 2000). Nesse cenário, Passaglia *et al.* (2015) observaram que o aumento da produção de ERO foi prevenido pelo tratamento com losartan, um antagonista do receptor AT₁, indicando a relação entre a hiperatividade do SRA e o aumento do estresse oxidativo diante do consumo de etanol. Dessa forma, os

mecanismos expostos explicariam a resposta de aumento da pressão arterial induzida pelo consumo crônico de etanol observada em nosso estudo

Em relação a IL-6, diversos estudos da literatura demonstram sua correlação com os processos que acarretam disfunção vascular. Há mais de duas décadas, Kranzhöfer *et al.* (1999) observaram que a ANG II promoveu aumento, de maneira dose-dependente, da produção de IL-6 por células do músculo liso vascular via ativação do receptor AT1. Han *et al.* (1999), pouco tempo depois, demonstraram que a ANG II promoveu ativação do fator nuclear kappa B (NF-κB) nas células da musculatura lisa vascular, e que essa resposta estava correlacionada com a transcrição gênica da IL-6.

Por sua vez, quando se liga ao seu receptor e forma o complexo com a estrutura transmembrana gp130, a IL-6 ativa uma cascata de respostas intracelulares que culminam na fosforilação da tirosina STAT3, que se desloca para o núcleo atuando na transcrição de genes alvo (Garbers *et al.*, 2018). O STAT3 está relacionado com o aumento da expressão de endotelina-1 (ET-1), um potente vasoconstritor, além de moléculas de adesão intracelulares e vasculares, ICAM-1 e VCAM-1, nas células endoteliais (Didion, 2017; Pioli & Faria, 2019; Feng *et al.*, 2022). Esses processos levam à maior adesão, rolamento e, conseqüentemente, infiltração de células imunes, principalmente neutrófilos, que caracterizam os estágios iniciais da inflamação, através da parede vascular (Watson *et al.*, 1996).

Nesse cenário, o aumento da infiltração de neutrófilos promovido pela IL-6 e o aumento da atividade do SRA, e conseqüentemente da ANG II, respostas promovidas pelo consumo crônico de etanol, induzem também o aumento de ERO, principalmente de O_2^- (Didion, 2017). Essa molécula, por sua vez, tem papel conhecido de ativação do NF-κB e, portanto, aumento da expressão de IL-6. Por fim, outro efeito também produzido pela IL-6 é o aumento da expressão dos receptores AT1, potencializando assim as respostas derivadas da ativação desses receptores pela ANG II (Wassmann *et al.*, 2004). Dessa forma, a relação entre a ANG II, a IL-6 e as ERO são interdependentes e, quando

ativadas, essas vias promovem um círculo vicioso que promove a inflamação e consequente disfunção vascular (Didion, 2017).

O nosso trabalho, dessa forma, demonstrou pela primeira vez que a utilização de animais nocautes para a IL-6 preveniu o aumento da pressão arterial induzido pelo consumo crônico de etanol, indicando que essa citocina participa dessa resposta. Esse dado corrobora com trabalhos da literatura que já demonstraram que a utilização de animais nocautes para a IL-6 previnem o aumento da pressão arterial induzida, por exemplo, pela infusão de ANG II (Coles *et al.*, 2007; Sturgis *et al.*, 2008; Manhiani *et al.*, 2015). Sugere-se, portanto, que a IL-6 estaria envolvida na resposta inicial do aumento da pressão arterial, especialmente relacionada à infiltração de neutrófilos, que caracteriza a fase inicial da inflamação vascular. Essas células, por serem capazes de produzir ERO e IL-6, promoveriam a disfunção vascular e o consequente quadro hipertensivo. A contínua exposição ao consumo crônico de etanol, no entanto, permaneceria promovendo estímulos danosos, principalmente relacionados ao aumento do estresse oxidativo, levando ao aumento da pressão arterial por mecanismos que independem da IL-6, o que explicaria a semelhança entre os níveis pressóricos dos animais nocautes para a IL-6 e os animais WT a partir da 9ª semana de tratamento. Nesse cenário, o leito arterial mesentérico, composto por artérias de resistência e por um PVAT que é fonte importante da IL-6, sofreria os efeitos deletérios relacionados à inflamação vascular e ao dano oxidativo e, assim, disfunção vascular e aumento da pressão arterial.

Em resumo, observamos no presente trabalho que a IL-6 está envolvida no aumento do estresse oxidativo em PVAT de LAM de camundongos submetidos ao consumo crônico de etanol. Nesse sentido, demonstramos que a utilização de animais nocautes para essa citocina previne parcialmente o aumento dos níveis de O_2^- e TBARS. Além disso, observamos também que a IL-6 também participa da infiltração de neutrófilos nesse tecido, uma vez que a utilização de animais IL-6^{-/-} preveniu completamente o aumento da atividade da enzima mieloperoxidase. Por fim,

demonstramos pela primeira vez através do presente trabalho que a IL-6 participa do aumento inicial dos níveis de pressão arterial induzido pelo consumo crônico de etanol.

7. CONCLUSÕES

A partir dos dados obtidos no presente trabalho, concluímos que a IL-6 participa do aumento do quadro de estresse oxidativo induzido pelo consumo crônico de etanol em LAM de camundongos, e que essa participação ocorre de maneira dependente do PVAT. Além disso, concluímos que a IL-6 também está envolvida no aumento inicial da pressão arterial induzida pelo consumo crônico de etanol.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- Andrade, AG. Álcool e a Saúde dos Brasileiros: Panorama 2021 / Organizador: Arthur Guerra de Andrade. – 1ed. – São Paulo: Centro de Informações sobre Saúde e Álcool (CISA), 2021. 128p.
- Anthony *et al.* Mechanisms linking adipose tissue inflammation to cardiac hypertrophy and fibrosis. *Clin Sci (Lond)*. 2019;133(22):2329-2344.
- Aratani, Y. Myeloperoxidase: Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2018;640:47-52.
- Ayala-Lopez *et al.* Perivascular adipose tissue contains functional catecholamines. *Pharmacol. Res. Perspect.* 2014;2(3):e00041.
- Berthoud *et al.* Vagaries of adipose tissue innervation. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2006;291(5):1240-1242.
- Bomfim *et al.* Electrophysiological properties and augmented catecholamine release from chromaffin cells of WKY and SHR rats contributing to the hypertension development elicited by chronic EtOH consumption. *Eur J Pharmacol.* 2017;803:65-77.
- Boydens *et al.* Adipose Tissue as Regulator of Vascular Tone. *Curr. Hypertens. Rep.* 2012;14:270-278.
- Brands *et al.* Interleukin 6 knockout prevents angiotensin II hypertension: role of renal vasoconstriction and janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3 activation. *Hypertension.* 2010;56(5):879-884.
- Carda *et al.* Acute restraint stress induces endothelial dysfunction: role of vasoconstrictor prostanoids and oxidative stress. *Stress.* 2015;18(2):233- 43.
- Carey RM. Newly discovered components and actions of the renin-angiotensin system. *Hypertension.* 2013;62(5):818-22.
- Ceron *et al.* Vascular oxidative stress: a key factor in the development of hypertension associated with ethanol consumption. *Curr. Hypertens. Rev.* 2014;10(4):213-222.
- Ceron *et al.* Chronic ethanol consumption increases vascular oxidative stress and the mortality induced by sub-lethal sepsis: Potential role of iNOS. *Eur J Pharmacol* 2018;825:39-47.
- Chae *et al.* Blood pressure and inflammation in apparently healthy men. *Hypertension.* 2001;38(3):399-403.
- Cheng *et al.* Perivascular Adipose Tissue: the Sixth Man of the Cardiovascular System. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 2018;32(5):481-502.

- Coles *et al.* Classic interleukin-6 receptor signaling and interleukin-6 trans-signaling differentially control angiotensin II-dependent hypertension, cardiac signal transducer and activator of transcription-3 activation, and vascular hypertrophy in vivo. *Am J Pathol.* 2007;171(1):315-325.
- Constantino *et al.* Regulation of lung oxidative damage by endogenous superoxide dismutase in sepsis. *Intensive Care Medicine Experimental* 2014;2(1):17.
- Didion, SP. Cellular and Oxidative Mechanisms Associated with Interleukin-6 Signaling in the Vasculature. *Int J Mol Sci.* 2017;18(12):2563.
- Do Vale *et al.* Nebivolol prevents ethanol-induced reactive oxygen species generation and lipoperoxidation in the rat kidney by regulating NADPH oxidase activation and expression. *Eur. J. Pharmacol.* 2017;799:33-40.
- Do Vale *et al.* Nebivolol prevents vascular oxidative stress and hypertension in rats chronically treated with ethanol. *Atherosclerosis.* 2018;274:67-76.
- Do Vale, GT; Tirapelli, CR. Are Reactive Oxygen Species Important Mediators of Vascular Dysfunction? *Current Hypertension Reviews* 2019;15:1-6.
- Ensan *et al.* Self-renewing resident arterial macrophages arise from embryonic CX3CR1(+) precursors and circulating monocytes immediately after birth. *Nat. Immunol.* 2016;17:159–168.
- Feng *et al.* The Role of Interleukin-6 Family Members in Cardiovascular Diseases. *Front Cardiovasc Med.* 2022;9:818890.
- Förstermann U, Münzel T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation.* 2006;113(13):1708-14.
- Frangie, C; Daher, J. Role of myeloperoxidase in inflammation and atherosclerosis (Review). *Biomed Rep.* 2022;16(6):53.
- Fried *et al.* Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83(3):847-850.
- Gao *et al.* Perivascular adipose tissue promotes vasoconstriction: the role of superoxide anion. *Cardiovasc Res.* 2006;71(2):363-373.
- Garbers *et al.* Interleukin-6: designing specific therapeutics for a complex cytokine. *Nat Rev Drug Discov.* 2018;17(6):395-412.
- Gonzaga *et al.* Ethanol withdrawal increases oxidative stress and reduces nitric oxide bioavailability in the vasculature of rats. *Alcohol.* 2015;49(1):47-56.
- González *et al.* Deletion of interleukin-6 prevents cardiac inflammation, fibrosis and dysfunction without affecting blood pressure in angiotensin II-high salt-induced hypertension. *J Hypertens.* 2015;33(1):144-152.

- Gulcin, I. Antioxidants and antioxidant methods: an update review. *Archives of Toxicology*. 2020;94:651-715.
- Han *et al.* Angiotensin II induces interleukin-6 transcription in vascular smooth muscle cells through pleiotropic activation of nuclear factor-kappa B transcription factors. *Circ Res*. 1999;84(6):695-703.
- Heinrich *et al.* Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J*. 1990;265(3):621-36.
- Hurst *et al.* IL-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation. *Immunity*. 2001;14(6):705-714.
- Husain *et al.* Chronic ethanol and nicotine interaction on rat tissue antioxidant defense system. *Alcohol* 2001;25(2):89-97.
- Husain *et al.* Down regulation of aortic nitric oxide and antioxidant systems in chronic alcohol-induced hypertension in rats. *Hum. Exp. Toxicol*. 2007;26(5):427-34.
- Husain *et al.* Chronic ethanol ingestion induces aortic inflammation/oxidative endothelial injury and hypertension in rats. *Hum. Exp. Toxicol*. 2011;30(8):930-939.
- Ilhan, MN; Yapar, D. Alcohol consumption and alcohol policy. *Turk J Med Sci*. 2020;50(5):1197-1202.
- Iwai *et al.* AT₂ receptor deficiency attenuates adipocyte differentiation and decreases adipocyte number in atherosclerotic mice. *Am J Hypertens*. 2009;22(7):784-791.
- Jones *et al.* The soluble interleukin 6 receptor: mechanisms of production and implications in disease. *FASEB J*. 2001;15(1):43-58.
- Jones, SA. Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. *J Immunol*. 2005;175(6):3463-3468.
- Jones, SA; Jenkins, BJ. Recent insights into targeting the IL-6 cytokine family in inflammatory diseases and cancer. *Nat Rev Immunol*. 2018;18(12):773-789.
- Kim *et al.* Regulation of renin secretion and expression in mice deficient in beta1- and beta2-adrenergic receptors. *Hypertension*. 2007;50(1):103-9.
- Korkmaz *et al.* Activation of MEK1/ERK1/2/iNOS/sGC/PKG pathway associated with peroxynitrite formation contributes to hypotension and vascular hyporeactivity in endotoxemic rats. *Nitric Oxide*. 2011;24(3):160-172.
- Kranzhöfer *et al.* Angiotensin induces inflammatory activation of human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19(7):1623-1629.
- Lee *et al.* Perivascular adipose tissue inhibits endothelial function of rat aortas via caveolin-1. *PLoS One* 9(6):e99947, 2014.
- Leite *et al.* Ethanol-induced erectile dysfunction and increased expression of pro-inflammatory proteins in the rat cavernosal smooth muscle are mediated by NADPH oxidase-derived reactive oxygen species. *Eur. J. Pharmacol*. 2017;804:82-93.

- Lohn *et al.* Periadventitial fat releases a vascular relaxing factor. *Faseb. J.* 2002;16:1057–1063.
- Lushchak, VI; Storey, KB. Oxidative Stress concept updated: definitions, classifications, and regulatory pathways implicated. *EXCLI J.* 2021;20:956-967.
- Luther, JM; Brown, NJ. The renin-angiotensin-aldosterone system and glucose homeostasis. *Trends Pharmacol Sci.* 2011;32(12):734-739.
- Manhiani *et al.* The role of IL-6 in the physiologic versus hypertensive blood pressure actions of angiotensin II. *Physiol Rep.* 2015;3(10):e12595.
- Marchi *et al.* NADPH Oxidase Plays a Role on Ethanol-Induced Hypertension and Reactive Oxygen Species Generation in the Vasculature. *Alcohol Alcohol.* 2016;51(5):522-34.
- Matusik *et al.* Do we know enough about the immune pathogenesis of acute coronary syndromes to improve clinical practice? *Thromb Haemost.* 2012;108:443-456.
- Meléndez *et al.* Interleukin 6 mediates myocardial fibrosis, concentric hypertrophy, and diastolic dysfunction in rats. *Hypertension.* 2010;56(2):225-231.
- Ndrepepa, G. Myeloperoxidase – A bridge linking inflammation and oxidative stress with cardiovascular disease. *Clinica Chimica Acta.* 2019;493:36-51.
- Nussbaum *et al.* Myeloperoxidase: A Leukocyte-Derived Protagonist of Inflammation and Cardiovascular Disease. *Antioxid Redox Signal.* 2013;18(6):692-713.
- Passaglia *et al.* Angiotensin type 1 receptor mediates chronic ethanol consumption-induced hypertension and vascular oxidative stress. *Vascul Pharmacol.* 2015;74:49-59.
- Pioli, MR; Faria, AP. Pro-inflammatory Cytokines and Resistant Hypertension: Potential for Novel Treatments? *Curr Hypertens Rep.* 2019;21(12):95.
- Polikandriotis *et al.* Chronic ethanol ingestion increases superoxide production and NADPH oxidase expression in the lung. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2006; 34(3):314-319.
- Rajsheker *et al.* Crosstalk between perivascular adipose tissue and blood vessels. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2010;10:191-196.
- Robinson *et al.* Interleukin-6 trans-signaling inhibition prevents oxidative stress in a mouse model of early diabetic retinopathy. *Redox Biology.* 2020;34:101574.
- Rodiño-Janeiro *et al.* Current status of NADPH oxidase research in cardiovascular pharmacology. *Vasc Health Risk Manag.* 2013;9:401–428.
- Rojas *et al.* Role of IL-6 in Angiotensin II-induced retinal vascular inflammation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51(3):1709-1718.
- Schenkel *et al.* T cell memory. Resident memory CD8 T cells trigger protective innate and adaptive immune responses. *Science.* 2014;346:98–101.
- Schrader *et al.* IL-6 deficiency protects against angiotensin II induced endothelial dysfunction and hypertrophy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27(12):2576-2581.

- Shirpoor *et al.* Vasoprotective effect of vitamin E: rescue of ethanol-induced atherosclerosis and inflammatory stress in rat vascular wall. *Int Immunopharmacol.* 2013;16(4):498-504.
- Silva *et al.* Downregulation of the vascular renin-angiotensin system by aerobic training - focus on the balance between vasoconstrictor and vasodilator axes. *Circ J.* 2015;79(6):1372- 80.
- Skurk *et al.* Angiotensin II stimulates the release of interleukin-6 and interleukin-8 from cultured human adipocytes by activation of NF-kappaB. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(7):1199-1203.
- Simplicio *et al.* Reactive oxygen species derived from NAD(P)H oxidase play a role on ethanol-induced hypertension and endothelial dysfunction in rat resistance arteries. *J. Physiol. Biochem.* 2017a;73(1):5-16.
- Simplicio *et al.* Tumor necrosis factor- α receptor 1 contributes to ethanol-induced vascular reactive oxygen species generation and hypertension. *J Am Soc Hypertens.* 2017b;11(10):684-696.
- Soltis, EE; Cassis, LA. Influence of perivascular adipose tissue on rat aortic smooth muscle responsiveness. *Clin. Exp. Hypertens.* 1991;13:277–296.
- Sousa *et al.* Ethanol and cyclophosphamide induce similar nephrotoxic effects: possible role for Nox4 and superoxide. *Can J Physiol Pharmacol.* 2020;99(7):744-751.
- Sousa *et al.* Inhibition of inducible nitric oxide synthase protects against the deleterious effects of sub-lethal sepsis and ethanol in the cardiorenal system. *Can J Physiol Pharmacol.* 2021;99(12):1324-1332.
- Sturgis *et al.* The role of aldosterone in mediating the dependence of angiotensin hypertension on IL-6. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2009;297(6):R1742-1748.
- Szasz, T; Webb, RC. Perivascular adipose tissue: more than just structural support. *Clin. Sci.* 2012;122:1-12.
- Szasz *et al.* The influence of perivascular adipose tissue on vascular homeostasis. *Vasc Health Risk Manag.* 2013;9:105-116.
- Takaoka *et al.* Endovascular injury induces rapid phenotypic changes in perivascular adipose tissue. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30(8):1576-1582.
- Tirapelli *et al.* Effect of ethanol consumption on blood pressure and rat mesenteric arterial bed, aorta and carotid responsiveness. *J Pharm Pharmacol.* 2007;59(7):985-993.
- Tirapelli *et al.* Ethanol consumption increases blood pressure and alters the responsiveness of the mesenteric vasculature in rats. *J Pharm Pharmacol.* 2008;60(3):331-341.
- Touyz, RM; Briones, AM. Reactive oxygen species and vascular biology: implications in human hypertension. *Hypert. Res.* 2011;34:5-14.
- Touyz RM, Schiffrin EL. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev.* 2000;52(4):639-72.

- Urso *et al.* Blood ethanol levels in sober alcohol users seen in an emergency room. *Life Sci.* 1981;28(9):1053-1056.
- Vermot *et al.* NADPH Oxidases (NOX): An Overview from Discovery, Molecular Mechanisms to Physiology and Pathology. *Antioxidants (Basel)*. 2021;10(6):890.
- Wang *et al.* Interleukin 6 induces expression of NADPH oxidase 2 in human aortic endothelial cells via long noncoding RNA MALAT1. *Pharmazie*. 2016;71(10):592-597.
- Wassmann *et al.* Interleukin-6 induces oxidative stress and endothelial dysfunction by overexpression of the angiotensin II type 1 receptor. *Circ Res.* 2004;94(4):534-541.
- Watson *et al.* IL-6 acts on endothelial cells to preferentially increase their adherence for lymphocytes. *Clin Exp Immunol.* 1996;105(1):112-119.
- Wei *et al.* Differential phenotypes of tissue-infiltrating T cells during angiotensin II-induced hypertension in mice. *PLoS One* 9:e114895, 2014.
- World Health Organization (2018). Global status report on alcohol and health. (<https://www.who.int/publications/i/item/9789241565639>, accessed 09 March 2022).
- Wung, BS; Ni, CW; Wang, DL. ICAM-1 induction by TNFalpha and IL-6 is mediated by distinct pathways via Rac in endothelial cells. *J Biomed Sci.* 2005a;12(1):91-101.
- Wung *et al.* Resveratrol suppresses IL-6-induced ICAM-1 gene expression in endothelial cells: effects on the inhibition of STAT3 phosphorylation. *Life Sci.* 2005b;78(4):389-397.
- Yeligar *et al.* Ethanol induces oxidative stress in alveolar macrophages via upregulation of NADPH oxidases. *J. Immunol.* 2012;188 (8):3648–3657.
- Yudkin *et al.* Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link? *Atherosclerosis* 2000;148(2):209-14.
- Zhang *et al.* Interleukin 6 underlies angiotensin II-induced hypertension and chronic renal damage. *Hypertension.* 2012;59(1):136-144.

