

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

ESCOLA DE ENFERMAGEM DE RIBEIRÃO PRETO

KATIUSCIA MARTINS DE ARAUJO

Efeito do consumo de etanol em padrão *binge* sobre o estresse oxidativo sistêmico

RIBEIRÃO PRETO

2020

KATIUSCIA MARTINS DE ARAUJO

Efeito do consumo de etanol em padrão *binge* sobre o estresse oxidativo sistêmico

Dissertação apresentada à Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Enfermagem Psiquiátrica.

Linha de pesquisa: Uso e Abuso de Álcool e Drogas

Orientador: Carlos Renato Tirapelli

RIBEIRÃO PRETO

2020

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 Araujo, Kátiuscia Martins

Efeito do consumo de etanol em padrão *binge* sobre o estresse oxidativo sistêmico. Ribeirão Preto, 2020.

74 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Enfermagem Psiquiátrica.

Orientador: Carlos Renato Tirapelli

1. Binge drinking. 2. etanol. 3. estresse oxidativo 4. receptores AT₁.

DE ARAUJO, Katiuscia Martins

Efeito do consumo de etanol em padrão *binge* sobre o estresse oxidativo sistêmico

Dissertação apresentada à Escola de Enfermagem de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Mestre em Ciências, Programa
de Pós-Graduação em Enfermagem Psiquiátrica.

Aprovado em / /

Presidente

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Comissão Julgadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

DEDICATÓRIA

Quero dedicar esse trabalho aos meus pais Rosa e Márcio.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida, pela saúde e força nos momentos mais turbulentos.

Aos meus pais por me ajudarem e acreditarem em mim. A quem devo tudo que conquisto.

A minha prima Renata e seu marido Tadeu pelos conselhos, incentivo e todo o tipo de ajuda.

Às minhas amigas Fátima e Liene pela amizade.

Ao professor Carlos Renato Tirapelli pela oportunidade e paciência. Desejo de todo o coração sucesso em sua vida, em seu laboratório e muita saúde.

Aos colegas de laboratório: Wanessa, Carla, Gabriel, Ana Paula, Victor, José, Sabrina, Arthur, Kathleen, Júnior, Thales e Gustavo por me ajudarem diretamente ou indiretamente nos experimentos no laboratório, na escrita da qualificação e da dissertação.

Um agradecimento em especial a Ana Paula, Carla, a Wanessa e ao Gabriel que estão a mais tempo nessa jornada, que sempre estiveram dispostos a ensinar e compartilhar ideias. Meu desejo é que vocês sejam imensamente recompensados pelos seus esforços.

Ao Lucas pela disponibilidade e ajuda em todos os momentos solicitados.

A professora Claudia Maria Padovan por ter disponibilizado seu laboratório e biotério para o tratamento dos meus animais.

Ao Rodrigo pela ajuda e espaço no laboratório e biotério da prof. Claudia.

A Dr. Diane do Programa de Farmacologia por seus ensinamentos sobre a coleta de sangue e amizade.

Aos professores Dr. Riccardo Lacchini e Dr. Fernando Carneiro pelas observações apontadas no meu exame de qualificação.

A todos os professores das disciplinas ministradas no cumprimento dos créditos. Seria quase impossível citá-los pois tive a oportunidade de frequentar a Escola de Enfermagem da USP – RP, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de RP. Faculdade de Filosofia, Letras e Ciências Humanas e Faculdade de Medicina de RP.

Ao laboratório de Química Analítica da FCFUSP-RP por ter disponibilizado o espaço para a realização de experimento.

A secretária do programa, Adriana pela disposição e auxílio.

A CAPES pelo auxílio financeiro.

RESUMO

ARAÚJO, K.M: **Efeito do consumo de etanol em padrão *binge* sobre o estresse oxidativo sistêmico**, 2020. 73 folhas. Dissertação de Mestrado – Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

O consumo intermitente de etanol, denominado *binge drinking* está relacionado a prejuízos para a saúde do indivíduo. *Binge drinking* descreve o padrão de consumir bebidas alcoólicas que resulta em concentração sanguínea de etanol igual ou superior a 0,08 g/dL (consumo de 70/56 gramas de etanol para homens/ mulheres) em um período de 2 horas. Os mecanismos que medeiam os danos orgânicos induzidos pelo consumo de etanol em padrão *binge* não são conhecidos. Portanto, o desenvolvimento de modelos experimentais que permitam o melhor entendimento desses mecanismos é de interesse. A hipótese desse estudo é a de que o consumo em *binge* ative os receptores AT₁ que irá promover aumento do estresse oxidativo sistêmico. Portanto, o presente projeto foi delineado de forma a investigar a participação dos receptores AT₁ no estresse oxidativo sistêmico induzido pelo consumo de etanol em padrão *binge*.

Com esse propósito, ratos *Wistar Hannover* com idade entre 60 e 70 dias (270 a 300 g) foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos: 1) Controle: os animais tiveram livre acesso a água e receberam diariamente água por gavagem; 2) Etanol *binge*: os animais tiveram livre acesso a água e receberam etanol na dose de 2 g/kg (10 mL/kg de uma solução 26% v./v.) por gavagem por período de 5 semanas. A administração de etanol foi realizada 4 dias por semana; 3) Losartan: os animais tiveram livre acesso a água e receberam losartan (10 mg/kg) diariamente por gavagem; 4) Etanol *binge* + losartan: os animais tiveram livre acesso a água e receberam etanol na dose de 2 g/kg por gavagem por período de 5 semanas. Esses animais também receberam losartan (10 mg/kg) diariamente por gavagem. Ao término do tratamento os animais foram anestesiados com uretana 1,25 g/kg em solução 25% (5 mL/kg) e mortos por exsanguinação seguida do rompimento do diafragma. O sangue e o coração (ventrículo esquerdo) foram coletados para realização de análises bioquímicas. O tratamento com etanol não alterou o peso dos animais ao longo do tratamento. Não foram detectadas diferenças do consumo de ração e de água entre os grupos ao longo das 5 semanas de tratamento. Os resultados mostraram que o consumo de etanol em padrão *binge* não alterou a concentração plasmática de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) bem como a atividade plasmática das enzimas superóxido *dismutase* (SOD), da concentração plasmática de glutathiona reduzida (GSH) e da atividade plasmática da catalase. Perfil semelhante foi observado no ventrículo esquerdo, além da não observação da expressão proteica da ERK 1/2. Com isso, o consumo de etanol em *binge* não alterou o estresse oxidativo sistêmico e tecidual ou alteração dos sistemas de defesa antioxidante.

Descritores: *Binge drinking*; etanol; estresse oxidativo; receptores AT₁.

ABSTRACT

ARAÚJO, K.M: **Effect of ethanol consumption in a binge pattern on systemic oxidative stress**, 2020. 73 pages. Master's Dissertation - Ribeirão Preto School of Nursing, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Intermittent consumption of ethanol, called binge drinking, is related to damage to the individual's health. Binge drinking describes the pattern of consuming alcoholic beverages that results in blood ethanol concentration equal to or greater than 0.08 g / dL (consumption of 70/56 grams of ethanol for men / women) in a period of 2 hours. The mechanisms that mediate organic damage induced by ethanol consumption in a binge pattern are not known. Therefore, the development of experimental models that allow a better understanding of these mechanisms is of interest. The hypothesis of this study is that consumption in binge activates AT₁ receptors that will promote an increase in systemic oxidative stress. Therefore, the present project was designed to investigate the participation of AT₁ receptors in systemic oxidative stress induced by the consumption of ethanol in a binge pattern.

For this purpose, Wistar Hannover rats aged between 60 and 70 days (270 to 300 g) were randomly assigned to 4 groups: 1) Control: the animals had free access to water and received daily water by gavage; 2) Binge ethanol: the animals had free access to water and received ethanol at a dose of 2 g / kg (10 mL / kg of a 26% v./v. Solution) by gavage for a period of 5 weeks. Ethanol was administered 4 days a week; 3) Losartan: the animals had free access to water and received losartan (10 mg / kg) daily by gavage; 4) Ethanol binge + losartan: the animals had free access to water and received ethanol at a dose of 2 g / kg per gavage for a period of 5 weeks. These animals also received losartan (10 mg / kg) daily by gavage. At the end of the treatment, the animals were anesthetized with 1.25 g / kg urethane in 25% solution (5 mL / kg) and killed by exsanguination followed by rupture of the diaphragm. Blood and heart (left ventricle) were collected for biochemical analysis. Treatment with ethanol did not change the weight of the animals during the treatment. There were no differences in feed and water consumption between groups over the 5 weeks of treatment. The results showed that the consumption of ethanol in a binge pattern did not alter the plasma concentration of substances reactive to thiobarbituric acid (TBARS) and hydrogen peroxide (H₂O₂) as well as the plasma activity of the enzymes superoxide dismutase (SOD), the plasma concentration of reduced glutathione (GSH) and plasma catalase activity. A similar profile was observed in the left ventricle, in addition to not observing ERK 1/2 protein expression. As a result, ethanol consumption in binge did not alter systemic and tissue oxidative stress or alter antioxidant defense systems.

Keywords: Binge drinking; ethanol; oxidative stress; AT₁ receptors.

RESUMEN

ARAÚJO, K.M: **Efecto del consumo de etanol en un patrón excesivo sobre el estrés oxidativo sistémico**, 2020. 73 hojas. Disertación de Maestría - Escuela de Enfermería Ribeirão Preto, Universidad de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

El consumo intermitente de etanol, llamado consumo excesivo de alcohol, está relacionado con el daño a la salud del individuo. El consumo excesivo de alcohol describe el patrón de consumo de bebidas alcohólicas que produce una concentración de etanol en la sangre igual o mayor a 0.08 g / dL (consumo de 70/56 gramos de etanol para hombres / mujeres) en un período de 2 horas. Se desconocen los mecanismos que median el daño orgánico inducido por el consumo de etanol en un patrón de atracones. Por lo tanto, el desarrollo de modelos experimentales que permitan una mejor comprensión de estos mecanismos es de interés. La hipótesis de este estudio es que el consumo en atracones activa los receptores AT₁ que promoverán un aumento del estrés oxidativo sistémico. Por lo tanto, el presente proyecto fue diseñado para investigar la participación de los receptores AT₁ en el estrés oxidativo sistémico inducido por el consumo de etanol en un patrón de atracones.

Para este propósito, las ratas Wistar Hannover con edades comprendidas entre 60 y 70 días (270 a 300 g) fueron asignadas aleatoriamente a 4 grupos: 1) Control: los animales tenían libre acceso al agua y recibían agua diariamente por sonda; 2) Etanol compulsivo: los animales tuvieron libre acceso al agua y recibieron etanol a una dosis de 2 g / kg (10 ml / kg de una solución al 26% v./v.) Por sonda durante un período de 5 semanas. Se administró etanol 4 días a la semana; 3) Losartán: los animales tuvieron libre acceso al agua y recibieron losartán (10 mg / kg) diariamente por sonda; 4) Atracones de etanol + losartán: los animales tuvieron libre acceso al agua y recibieron etanol a una dosis de 2 g / kg por sonda durante un período de 5 semanas. Estos animales también recibieron losartán (10 mg / kg) diariamente por sonda. Al final del tratamiento, los animales se anestesiaron con 1,25 g / kg de uretano en solución al 25% (5 ml / kg) y se sacrificaron por desangrado seguido de la ruptura del diafragma. Se recogieron sangre y corazón (ventrículo izquierdo) para análisis bioquímicos. El tratamiento con etanol no cambió el peso de los animales durante el tratamiento. No hubo diferencias en el consumo de alimento y agua entre los grupos durante las 5 semanas de tratamiento. Los resultados mostraron que el consumo de etanol en un patrón de atracones no alteró la concentración plasmática de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) y el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), así como la actividad plasmática de las enzimas superóxido dismutasa (SOD), la concentración plasmática de glutatión reducido (GSH) y actividad de catalasa plasmática. Se observó un perfil similar en el ventrículo izquierdo, además de no observar la expresión de la proteína ERK 1/2. Como resultado, el consumo de etanol en los atracones no alteró el estrés oxidativo sistémico y tisular ni alteró los sistemas de defensa antioxidante.

Pallavras llaves: Binge Drinking; etanol; estrés oxidativo; Receptores AT₁.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Efeito do consumo de etanol em padrão *binge* sobre o peso dos animais, consumo de ração e água.31
- Figura 2.** Efeito do consumo de etanol em padrão *binge* sobre as concentrações plasmáticas de ácido tiobarbitúrico (TBARS) em ratos.....32
- Figura 3.** Efeito do consumo de etanol em padrão *binge* sobre as concentrações plasmáticas de H₂O₂ em ratos.....32
- Figura 4.** Efeito do consumo de etanol em padrão *binge* sobre a atividade plasmática da SOD e da catalase em ratos.....33
- Figura 5.** Efeito do consumo de etanol em padrão *binge* sobre as concentrações plasmáticas de GSH em ratos.....34
- Figura 6.** Efeito do consumo de etanol em padrão *binge* sobre as concentrações de ácido tiobarbitúrico (TBARS) em ventrículo esquerdo.....35
- Figura 7.** Efeito do consumo de etanol em padrão *binge* sobre a produção de ânion superóxido (O₂^{•-}) e H₂O₂ em ventrículo esquerdo.....36

Figura 8. Efeito do consumo de etanol em padrão *binge* sobre a atividade da SOD em ventrículo esquerdo.....37

Figura 9. Efeito do consumo de etanol em padrão *binge* sobre as concentrações de GSH em ventrículo esquerdo.....38

Figura 10. Efeito do consumo de etanol em padrão *binge* sobre a expressão protéica da ERK 1/2 em ventrículo esquerdo.....39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL	Micro litro
μM	Micromolar
μg	Micrograma
°C	Graus Celsius
ANG II	Angiotensina II
ATP	Adenosina trifosfato
AVC	Acidente Vascular Cerebral
CaCl₂	Cloreto de Cálcio
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
dL	Decilitro
DTNB	Ácido 2-nitrobenzóico (5,5'-Dithiobis, reagente de Ellmans)
EERP	Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto
EDTA	Ácido etilenodiamino tetraacético
EGTA	Ácido Egtazico
E.P.M.	Erro Padrão da Média
ERO	Espécie Reativa de Oxigênio
g	gramas
GPx	Glutathione Peroxidase
GR	Glutathione reductase
GSH	Glutathione
GSSG	Dissulfeto oxidado

GPx	Glutationa peroxidase
h	Horas
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
HCl	Cloreto de Hidrogênio
HRP	<i>Peroxidase</i> horseradish
IAM	Infarto Agudo do Miocárdio
KCl	Cloreto de Potássio
Kg	Quilograma
KH₂PO₄	Hidrogenofosfato de Potássio
l	Litros
MDA	Malondialdeído
MEOS	Sistema oxidante de etanol microsossômico
MgSO₄	Sulfato de Magnésio
Mg	Miligrama
Min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
MTs	Metalotioneínas
NaCl	Cloreto de sódio
NAD(P)H	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NaHCO₃	Bicarbonato de Sódio
NIAAA	National Institute on Alcoholism and Alcohol Abuse
Nm	Nanômetro
Nmol	Nanomol

NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
OH[•]	Radical hidroxila
O₂	Oxigênio
O₂^{•-}	Ânion superóxido
ONOO⁻	Peroxinitrito
PBS	Tampão fosfato-salino
pH	Potencial de hidrogênio
SAMHSA	Substance Abuse and Mental Health Services Administration
Pg	Picograma
SENAD	Secretaria Nacional Antidrogas
SOD	Superóxido <i>Dismutase</i>
SRA	Sistema Renina Angiotensina
TCA	Ácido tricloracético
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TBARS	Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
URL	Unidade relativa de luz
USP	Universidade de São Paulo
Vol	Volume
V/V	Volume/ volume

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. OBJETIVOS.....	23
2.1. OBJETIVO GERAL	23
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
3.1. Grupos experimentais.....	24
3.2. Evolução temporal do ganho de peso e consumo de ração e água.....	25
3.3. Ensaio bioquímicos.....	25
3.3.1. Determinação das concentrações plasmática e tecidual de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	25
3.3.2. Determinação das concentrações plasmática e tecidual de H₂O₂.....	26
3.3.3. Determinação da atividade total plasmática e tecidual da SOD.....	26
3.3.4. Determinação das concentrações plasmática e tecidual da glutatona reduzida (GSH)	27
3.3.5. Determinação da atividade plasmática da catalase.....	27
3.3.6. Determinação da geração de O₂⁻ pela quimioluminescência da lucigenina.....	28
3.3.7. Western Immunoblotting.....	29
4. RESULTADOS.....	30
4.1. Efeito do consumo de etanol em padrão <i>binge</i> sobre o peso dos animais, consumo de ração e água.....	31
4.2. Efeito do consumo de etanol em padrão <i>binge</i> sobre as concentrações plasmáticas de ácido tiobarbitúrico (TBARS) em	

ratos.....	32
4.3. Efeito do consumo de etanol em padrão <i>binge</i> sobre as concentrações plasmáticas de H_2O_2 em ratos.....	32
4.4. Efeito do consumo de etanol em padrão <i>binge</i> sobre a atividade plasmática da SOD e da catalase em ratos.....	33
4.5. Efeito do consumo de etanol em padrão <i>binge</i> sobre as concentrações plasmáticas de GSH em ratos.....	34
4.6. Efeito do consumo de etanol em padrão <i>binge</i> sobre as concentrações de ácido tiobarbitúrico (TBARS) em ventrículo esquerdo.....	35
4.7. Efeito do consumo de etanol em padrão <i>binge</i> sobre a produção de ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e H_2O_2 em ventrículo esquerdo.....	36
4.8. Efeito do consumo de etanol em padrão <i>binge</i> sobre a atividade da SOD em ventrículo esquerdo.....	37
4.9. Efeito do consumo de etanol em padrão <i>binge</i> sobre as concentrações de GSH em ventrículo esquerdo.....	38
4.10. Efeito do consumo de etanol em padrão <i>binge</i> sobre a expressão protéica da ERK 1/2 em ventrículo esquerdo.....	39
5.DISCUSSÃO.....	40
6. CONCLUSÃO.....	56
7. REFERÊNCIAS.....	57

8. ANEXOS.....71

1. INTRODUÇÃO

O uso de substâncias psicoativas é um fenômeno frequente na população mundial, na qual, o etanol é a substância mais consumida em todo o mundo (ELLIOTT e BOWER, 2008). O consumo crônico de 30 gramas diários de etanol, ou de quantidades superiores é considerado excessivo e pode afetar diferentes sistemas do organismo levando ao quadro denominado alcoolismo (SANCHIS e ARAGÓN, 2007; SCHUCKIT, 2009), que é definido como uma síndrome multifatorial que acarreta comprometimento físico, mental e social (EDWARDS e GROSS, 1976).

Assim, a Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization - WHO*) publicou no ano de 2018, o Relatório Global sobre Álcool e a Saúde (*Global Status Report on Alcohol And Health*), mostrando que 43% da população mundial consome etanol atualmente e 5,3% (3 milhões/ano) de todas as mortes no mundo estão relacionados ao uso nocivo do etanol. Mostra ainda que o Brasil é o quarto maior consumidor de etanol das Américas (WHO, 2018). De fato, estudo realizado pela Secretaria Nacional de Políticas Antidrogas (SENAD) no ano de 2007 mostrou que 52% dos brasileiros acima de 18 anos consome algum tipo de bebida alcoólica pelo menos uma vez ao ano e que do total de homens adultos, 11% bebem todos os dias e 28% de uma a quatro vezes por semana. Em relação à intensidade do consumo de bebidas alcoólicas foi descrito que 24% da população brasileira consomem etanol frequentemente e de forma abusiva (cinco ou mais doses de etanol pelo menos uma vez por semana) e 29% consomem menos frequentemente ou não fazem uso abusivo da substância (SENAD, 2007).

Além disso, mais recentemente tem sido descrito que além do consumo crônico de etanol, o consumo de grande quantidade dessa substância em ocasião única de modo intermitente, denominado *Binge Drinking* também está relacionado a prejuízos físicos, mentais e sociais (PIANO *et al.*, 2017a).

Binge Drinking foi definido pelo órgão americano *National Institute of Alcohol Abuse and Alcoholism* (NIAAA) como o padrão de consumir bebidas alcoólicas que resulta em concentração sanguínea de etanol $\geq 0,08$ g/dl (17 mmol/l) que corresponde aproximadamente ao consumo de 70/56 gramas de etanol para homens/ mulheres em um período de 2 horas (NIAAA, 2004). Já o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC, EUA) define *Binge Drinking* como o consumo de 4 doses de etanol para mulheres e 5 doses para homens em uma única ocasião nos últimos 30 dias

enquanto o *Substance Abuse and Mental Health Services Administration* (SAMHSA, EUA) define *Binge Drinking* como o consumo de 5 ou mais doses de etanol na mesma ocasião ao menos em 1 dia nos últimos 30 dias. Já a WHO utiliza o termo *Heavy Episodic Drinking* e o define como adultos (idade superior a 15 anos) que consumiram ao menos 60 gramas de etanol ao menos em ocasião única no último mês (PIANO *et al.*, 2017b).

Atualmente, o consumo de etanol em padrão *binge* é uma preocupação mundial. Estudo realizado nos Estados Unidos com mais de 16 mil adolescentes mostrou que entre os anos de 2005 e 2011 o consumo de etanol em *binge* foi de cerca de 20% (PATRICK *et al.*, 2013). No Brasil, levantamento dos padrões de consumo de etanol realizado entre os anos de 2005 e 2006 identificou a prevalência de *Binge Drinking* em 28% dos adultos, sendo que 40% destes encontravam-se na faixa etária de 18 a 24 anos (LARANJEIRA *et al.*, 2010) e 53% dos adolescentes eram do sexo masculino (PINSKY *et al.*, 2010). Portanto, o *Binge Drinking* se tornou um problema de saúde pública mundial que afeta principalmente adolescentes e que está relacionado a prejuízos mentais, sociais e físicos (LARANJEIRA *et al.*, 2010; READ *et al.*, 2016; PIANO *et al.*, 2017a, 2018a; WHO, 2018).

Entretanto, o *Binge Drinking* é um assunto relativamente novo em pesquisas experimentais e pouco explorado, do ponto de vista fisiopatológico, pela literatura na última década. Uma importante limitação para o desenvolvimento de um modelo experimental sobre o assunto é a escassez de estudos que avaliam os mecanismos moleculares envolvidos no consumo de etanol em *binge* sobre os sistemas orgânicos e a falta de uma definição mais específica para o que pode ou não ser considerado *Binge Drinking*, pois a definição de *Binge Drinking* ou *Heavy Episodic Drinking* é controversa, permeada por conflitos de conceituação de uso e aspectos farmacocinéticos do etanol (SANCHEZ, 2017).

Todavia, estudos anteriores demonstram que o consumo excessivo de etanol figura como importante fator de risco no desenvolvimento de doenças hepáticas como doença hepática alcoólica e cirrose hepática (PAN *et al.*, 2006), doenças inflamatórias como gastrite e pancreatite (MINCIS e MINCIS, 2006), vários tipos de câncer, os mais comuns: cavidade oral, garganta, esôfago, estômago, fígado, pâncreas e cólon (BLOT, 1992; OGDEN e WIGHT, 1998; SEITZ *et al.*, 1998) e maior risco de acidente vascular encefálico, infarto agudo do miocárdio e desenvolvimento da hipertensão arterial

sistêmica (KLATSKY *et al.*, 1979; MOREYRA *et al.*, 1982; MACLURE, 1993; MAISCH, 2016; FERNÁNDEZ-SOLÀ, 2020). Vários fatores identificados podem contribuir diretamente e indiretamente para o risco de lesão tecidual induzida pelo etanol, tais como, padrão de consumo, tipo de bebida alcoólica, quantidade e frequência.

Baseado nisto, sugere-se que os componentes moleculares das células e tecidos sofram algum tipo de perturbação na presença do etanol e de seus efeitos sendo então, responsáveis por desencadear diversas doenças, dependendo desses fatores supracitados (HWANG *et al.*, 2020). Assim, foram descritos inúmeros mecanismos fisiopatológicos na exposição excessiva ao etanol, especialmente - a ativação da cascata do sistema renina angiotensina (SRA) - apresentando forte influência sobre vários sistemas além do cardiorrenal, como o sistema nervoso central, vasos sanguíneos e entre outros (UND HALBACH e ALBRECHT, 2006; PHILLIPS e DE OLIVEIRA, 2008; DO VALE *et al.*, 2018).

Estudos demonstram que o etanol é um potente ativador do SRA, resultando em aumento da concentração plasmática de seus mediadores endógenos, tais como, renina e angiotensinas 1 e 2 (PASSAGLIA *et al.*, 2015; DO VALE *et al.*, 2018), promovendo maior ativação do receptor AT₁, com posterior ativação do complexo enzimático NAD (P) H oxidase (MARCHI *et al.*, 2016) intensificando o estresse oxidativo sistêmico e tecidual (PASSAGLIA *et al.*, 2015; DO VALE *et al.*, 2018), com alteração da fosforilação das proteínas intracelulares, em especial as proteínas quinase ativadas por mitógenos (MAPKs – Mitogen-Activated Protein Kinases) (GU *et al.*, 2012).

O sistema renina-angiotensina (SRA) é um complexo sistema hormonal, cuja função principal está relacionada com a homeostasia hidroeletrolítica do organismo e com o controle da pressão arterial, estimulando também a liberação de aldosterona pelo córtex da suprarrenal (MENARD, 1993). No entendimento clássico do SRA, o peptídeo ativo, a ANG II é produzido sistemicamente pelo SRA clássico, onde a enzima renina circulante, produzida pelas células justa glomerulares nas arteríolas aferentes dos glomérulos renais, cliva o angiotensinogênio, uma proteína produzida pelo fígado, em ANG I. A liberação de renina é estimulada principalmente pela redução da pressão de perfusão renal, redução dos níveis de sódio na mácula densa localizada no túbulo distal, e pelo aumento da atividade simpática (KHAYAT *et al.*, 1981; TORRETTI, 1982). A ação da renina sobre o angiotensinogênio gera o decapeptídeo ANG I que é convertido em ANG II pela ação da enzima conversora de angiotensina (PHILLIPS *et al.*, 1993).

As ações fisiológicas da ANG II são mediadas pelos receptores AT₁ e AT₂ (DE GASPARO *et al.*, 2000). As principais ações fisiológicas da ANG II são mediadas pelos receptores AT₁ e incluem contração vascular, secreção de aldosterona, reabsorção de sódio tubular e ativação do sistema autônomo simpático (TOUYZ e SCHIFFRIN, 2000). Contudo, é importante frisar que o SRA pode ser encontrado em outros tecidos, além da suprarrenal, como em hipocampo do sistema nervoso e no ventrículo esquerdo do sistema cardiovascular, complementando a ação endócrina desse sistema envolvidos no mecanismo de doenças como a hipertensão arterial, por exemplo (NAKAGAWA *et al.*, 2020; RAPOSEIRAS-ROUBÍN *et al.*, 2020).

Além dos efeitos fisiológicos sobre os sistemas, a ANG II também induz a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) em diferentes tecidos (PAGANO *et al.*, 1997). Dentre as principais ERO produzidas, o ânion superóxido (O₂^{•-}) e o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) são particularmente importantes, pois ativam diferentes vias intracelulares de sinalização (MONTEZANO e TOUYZ, 2012). As ERO são relevantes na fisiopatologia de diferentes doenças e poderiam desempenhar importante função nas alterações orgânicas induzidas pelo consumo de etanol em padrão *binge*, assim como no consumo crônico de etanol.

A formação de ERO pode ocorrer pela ativação de receptores AT₁ pela ANG II e consequente ativação da enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato [NAD (P) H] *oxidase* (ZAFARI *et al.*, 1998). A NAD (P) H *oxidase* pertence a uma família de enzimas constituída atualmente por sete membros (Nox 1 a 5, Duox1 e Duox2) (MONTEZANO e TOUYZ, 2012). Estas subunidades catalíticas apresentam diferenças significativas, como por exemplo, suas subunidades estruturais, a preferência por diferentes substratos e o tempo de atividade (GRIEDLING *et al.*, 2000).

Há várias fontes disponíveis de produção de ERO além da NAD (P) H *oxidase*, como a xantina *oxidase*, óxido nítrico *sintase* (NOS) e a cadeia de transporte de elétrons mitocondriais. Entretanto, a NAD (P) H *oxidase* têm como função única e exclusiva de produzir ERO, enquanto as demais fontes as produzem como consequência de suas atividades primárias e são regulados pela presença de antioxidantes endógenos (SIES, 1997).

Além disso, é importante destacar que a ANG II aumenta o estresse oxidativo via ativação dos receptores AT₁ e as ERO geradas podem ativar a via de sinalização mediada pelas proteínas MAPKs (Mitogen-Activated Protein Kinases). As MAPKs

fazem parte da cascata de sinalização intracelular que controla diferentes processos celulares como o crescimento, inflamação e contração vascular (TOUYZ e SCHIFFRIN, 2000). São descritas três cascatas de MAPKs: a MAPKp42/44, que são quinases reguladas por sinal extracelular (ERK1/2 – Extracellular signal-regulated kinases 1 and 2); a MAPKp38 e quinase c-jun N-terminal ou quinase ativada por estresse (JNK/SAPK - c-jun N-terminal kinase ou Stress activated protein kinase). O bloqueio do SRA com um antagonista do receptor AT₁ (losartan) é capaz de prevenir o estresse oxidativo e a fosforilação das MAPKs induzidos pelo consumo crônico de etanol de etanol (YOGI *et al.*, 2012; GONZAGA *et al.*, 2014; PASSAGLIA *et al.*, 2015).

A defesa natural contra a produção aumentada das ERO é feita por sistemas antioxidantes enzimáticos, dentre os quais se destacam as enzimas superóxido *dismutase* (SOD) e Catalase (GONGORA *et al.*, 2005; TAJIMA *et al.*, 2009). A SOD é a primeira linha de defesa contra os efeitos prejudiciais das ERO, uma vez que catalisa a dismutação do O₂⁻ levando à formação de H₂O₂ e O₂. Três formas existentes da SOD são descritas em mamíferos de acordo com o conteúdo metálico presente sendo que a Cu-ZnSOD está localizada principalmente no citoplasma, a Mn-SOD na matriz mitocondrial e SOD-EC no ambiente extracelular (FREINBICHLER *et al.*, 2011). O H₂O₂ formado pela dismutação do O₂⁻ é uma molécula mais estável que o O₂⁻ e por esse motivo é a principal ERO relacionada a efeitos prejudiciais nos tecidos (MONTEZANO e TOUYZ, 2012). A concentração de H₂O₂ é regulada principalmente pela Catalase que promove a conversão de H₂O₂ a H₂O e O₂ (FRIDOVICH, 1997). A glutathiona é um tripeptídeo, antioxidante não enzimático e, por ser um agente redutor intracelular, desempenha importante papel na detoxificação celular por reagir com o OH⁻ e ONOO⁻ (GRIFFITH, 1999), ou por mecanismo catalisado pela enzima glutathiona *peroxidase* (GPx). Esta enzima protege o organismo do estresse oxidativo por catalisar a redução do H₂O₂ via oxidação de glutathiona reduzida (GSH) ao dímero GSSG (dissulfeto oxidado). Este processo é complementado pela enzima glutathiona *redutase* (GR), a qual recicla GSSG a GSH. Em condições de estresse oxidativo, para manter o balanço redox, o GSSG é exportado da célula por proteínas transportadoras dependentes de ATP, implicando que, em condições severas de estresse oxidativo, ocorre à depleção das concentrações de GSH (CNUBBEN *et al.*, 1996).

Como mencionado anteriormente, os sistemas antioxidantes endógenos regulam

a produção de ERO e são classificados como: enzimáticos e não enzimáticos, estando envolvidos em mecanismos de proteção contra a exposição excessiva das biomoléculas às ERO, e foi descoberto que esta pode produzir um fenômeno fisiológico denominado Estresse Oxidativo. No entanto, o termo estresse oxidativo foi originalmente conceituado como uma condição patológica associada a danos moleculares, tal como a peroxidação lipídica da membrana celular, causados pela desigualdade entre a quantidade de moléculas pró - oxidantes, como as ERO e a defesa antioxidante, como as enzimas superóxido *dismutase* (SOD) e catalase (CADENAS e SIES, 1985).

A participação dos receptores AT₁ no aumento do estresse oxidativo observada em diferentes modelos experimentais têm sido avaliadas por meio da utilização de antagonistas competitivos desses receptores, como o losartan (DAL-ROS *et al.*, 2010; YOGI *et al.*, 2012; SLEEM *et al.*, 2014; PASSAGLIA *et al.*, 2015). Esse antagonista é amplamente utilizado como ferramenta farmacológica desde a década de 90, devido a algumas de suas características, tais como a ação de longa duração e a sua seletividade para os receptores AT₁ da ANG II (WONG & TIMMERMANS, 1996). O losartan promove significativa redução da geração de ERO, aumento da biodisponibilidade de NO e aumento da capacidade antioxidante (HORNIG *et al.*, 2001; BARRA *et al.*, 2009; SLEEM *et al.*, 2014; PASSAGLIA *et al.*, 2015). Tais dados em conjunto justificam a ampla utilização deste antagonista em estudos experimentais na avaliação dos efeitos prejudiciais da ANG II/ AT₁.

Todavia, o estresse oxidativo pode ser sistêmico e/ou tecidual. O estresse oxidativo sistêmico pode ser verificado através dos ensaios plasmáticos e sua detecção pode indicar estresse oxidativo em um ou mais tecidos, verificado em ensaios teciduais. Nesse sentido, propõe-se que o dano oxidativo celular promova a liberação de substâncias tóxicas para o sangue com consequente alteração do balanço redox sistêmico, como mostra o estudo de Souza Jr *et al.* (2005), o qual, foi detectado a presença do malondialdeído (MDA) - um metabólito secundário de caráter tóxico, formado pela peroxidação lipídica, liberados no plasma de indivíduos que praticam exercício físico intenso indicando estresse oxidativo sistêmico proveniente de um algum tecido que sugere ser o músculo esquelético.

Em tecidos, moléculas pró - oxidantes podem formar novos compostos citotóxicos ou até mais citotóxico que o primário como mostra o estudo de Squadrito e Pryor (1995), que demonstram que o O₂^{•-} pode sequestrar o óxido nítrico (NO)

formando um composto citotóxico denominado peroxinitrito (ONOO^-) em vasos sanguíneos, corroborando outros estudos encontrados (RUBBO e O'DONNELL, 2005), assim como no tecido cardíaco (CAO e LI, 2004) indicando estresse oxidativo tecidual.

Contudo, os estudos sobre a biologia molecular e celular demonstram que há um equilíbrio fisiológico entre os sistemas pró - oxidantes e antioxidantes em organismos saudáveis, sendo encontrado inclusive no processo do envelhecimento (LIGUORI *et al.*, 2018). Porém, a exposição aguda a substâncias tóxicas como o etanol (ZIMA *et al.*, 2001), pode desencadear um desequilíbrio temporário nesses sistemas produzindo o estresse oxidativo de caráter transitório, ou seja, enquanto o etanol e seus efeitos estiverem presentes no organismo, pode haver desequilíbrio molecular entre a produção de ERO e a defesa antioxidante. Com isso, propõe-se que a ausência do fator desencadeador e dos efeitos sobre os sistemas podem possibilitar a manutenção dos sistemas, preservando o equilíbrio redox intracelular (CAVALCANTE e BRUIN, 2009; CEPERO, 2018).

A exposição crônica ao etanol é a persistência da exposição aguda que de um modo geral ocorre em menores doses. É o padrão de consumo praticado diariamente por um período maior de tempo e responsável pela dependência e intoxicação alcoólica. Tal situação, pode resultar em desequilíbrio prolongado dos sistemas pró - oxidantes e antioxidantes desencadeando o estresse oxidativo crônico (CAVALCANTE e BRUIN, 2009), um fenômeno que dificulta o restabelecimento dos sistemas oxidativos resultando em desequilíbrio redox celular envolvido na fisiopatologia de diferentes doenças, especialmente as hepáticas e cérebro – cardiovasculares, como observado no consumo crônico de etanol (CHEN *et al.*, 2000; JURCZUK *et al.*, 2004; PHILLIPS e DE OLIVEIRA, 2008; PASSAGLIA *et al.*, 2015; Do VALE *et al.*, 2018).

Nesse sentido, o *binge drinking* configura a exposição de uma grande quantidade de etanol em pelo menos um episódio em um mês, como descreve a WHO ao definir *binge drinking* como “o consumo de 60 gramas ou mais de etanol de modo intermitente em pelo menos uma ocasião no último mês” (PIANO, 2017). Com isso, é proposto que tal padrão de consumo anteceda um período de abstinência que pode ser de curto ou longo período (horas, dias ou um mês). Portanto, é justificável que o período da abstinência impeça o desenvolvimento do estresse oxidativo sistêmico e/ou tecidual transitório, permitindo assim o restabelecimento do equilíbrio redox celular, com ressalva de que esse padrão de consumo também apresenta alterações moleculares,

sendo responsável por efeitos, como a rigidez arterial (HWANG *et al.*, 2020) que à longo prazo pode promover o desenvolvimento de doenças semelhantes à exposição crônica do etanol, como a hipertensão arterial (RAPOSEIRAS-ROUBÍN *et al.*, 2020).

Nesse sentido, um estudo empregou o modelo experimental para investigar o efeito do *binge drinking* sobre a pressão arterial e função cardíaca em ratos (GU *et al.*, 2012), os resultados mostraram que o consumo de etanol em *binge* aumentou a pressão arterial e promoveu fosforilação da MAPKp38 no coração. Alguns delineamentos experimentais também foram criados para investigação dos mecanismos pelos quais o consumo de etanol em padrão *binge* afeta o sistema nervoso central (WARD *et al.*, 2009; KETCHESIN *et al.*, 2016; ZHAO *et al.*, 2018). Muitos estudos experimentais estão avançando quanto aos efeitos moleculares do *binge drinking* sobre os diversos tecidos (MARTELLUCCI *et al.*, 2020; MINZER *et al.*, 2020; MUKAMAL *et al.*, 2020; VANDEGRIFT *et al.*, 2020; VARLINSKAYA *et al.*, 2020).

É importante lembrar que tanto o efeito isolado do etanol quanto o estresse oxidativo desenvolvido pelos seus efeitos sobre os sistemas biológicos são determinados pelo modelo de consumo e pelo tempo de exposição. Contudo, a grande limitação envolvida no entendimento dos efeitos do *binge drinking* se deve à falta de uma definição mais precisa sobre esse assunto e os modelos de estudos experimentais encontrados se diferem muito quanto a dose e o tempo de tratamento (GU *et al.*, 2012; SABINO *et al.*, 2013; BRANCATO *et al.*, 2018; JEANBLANC *et al.*, 2018; SATTA *et al.*, 2018; ZHAO *et al.*, 2018) dificultando ainda mais a compreensão do fenômeno.

O conjunto de dados mostra que o consumo de etanol em *binge* afeta vários sistemas orgânicos. No entanto, os mecanismos moleculares envolvidos nessa resposta não são totalmente compreendidos. Nesse estudo foi empregado modelo experimental para investigar as consequências do *binge drinking* sobre o estresse oxidativo sistêmico, uma vez que alterações do estado redox sistêmico poderiam estar relacionados a danos em diferentes tecidos.

A hipótese desse estudo é a de que o consumo em *binge* induza ativação dos receptores AT₁ que irá promover aumento do estresse oxidativo sistêmico. Portanto, o presente projeto foi delineado de forma a investigar a participação dos receptores AT₁ nas alterações sistêmicas induzidas pelo consumo de etanol.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Investigar a participação dos receptores AT₁ no estresse oxidativo sistêmico induzido pelo consumo de etanol em padrão *binge*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1. Verificar se o consumo de etanol em padrão *binge* induz estresse oxidativo sistêmico.

2.2.2. Verificar se o consumo de etanol em padrão *binge* induz formação de H₂O₂ plasmático.

2.2.3. Verificar se o consumo de etanol em padrão *binge* induz alteração da atividade da SOD plasmática.

2.2.4. Verificar se o consumo de etanol em padrão *binge* induz alteração nas concentrações plasmáticas de GSH.

2.2.5. Verificar se o consumo de etanol em padrão *binge* induz alteração da atividade da catalase plasmática.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Grupos experimentais.

Foram utilizados ratos *Wistar Hannover* com idade entre 60 e 70 dias (270 a 300 g) provenientes do Biotério Central do *Campus* de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP). Os ratos foram mantidos no Biotério de Manutenção da EERP/USP com temperatura controlada por ar condicionado tipo *split* (22-24°C), ciclo automático de claro/escuro de 12 horas (luzes acesas entre 06:00 e 18:00 horas) e livre acesso à água e ração. Os ratos permaneceram em *rack* ventilada (modelo AL21, ALESCO, Brasil) agrupados em 2 em mini-isoladores de polissulfona (modelo Ventlife, ALESCO, Brasil) com área de 1.632 cm² (48 cm x 34 cm x 21 cm). A cama de maravalha foi trocada 3 vezes/semana. A desinfecção dos mini-isoladores foi feita com hipoclorito de sódio (0,5%).

Os ratos foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos: 1) Controle: os animais tiveram livre acesso a água e receberam diariamente água por gavagem; 2) Etanol *binge*: os animais tiveram livre acesso a água e receberam etanol na dose de 2 g/kg (10 mL/kg de uma solução 26% v./v.) por gavagem por período de 5 semanas. A administração de etanol foi feita 4 dias por semana com base no estudo de GU *et al.* (2012); 3) Losartan: os animais tiveram livre acesso a água e receberam losartan (10 mg/kg) diariamente por gavagem (diluído em água); 4) Etanol *binge* + losartan: os animais tiveram livre acesso a água e receberam etanol na dose de 2 g/kg por gavagem por período de 5 semanas. Esses animais também receberam losartan (10 mg/kg) diariamente por gavagem.

O período de tratamento e a dose de etanol foram escolhidos com base em estudo prévio de GU *et al.* (2012). A dose de 10 mg/kg de losartan utilizada teve por base trabalhos prévios da literatura nos quais o fármaco mostrou ter atividade antioxidante (FABIANI *et al.*, 2000; YOSHITANI *et al.*, 2002; PASSAGLIA *et al.*, 2015). Os protocolos utilizados nesse estudo estão de 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 (19.1.390.22.4). Em todos os protocolos os animais foram anestesiados intraperitonealmente com uretana 1,25 g/kg em solução 25% (5 mL/kg) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e mortos

por exsanguinação seguida do rompimento do diafragma. O sangue e o coração (ventrículo esquerdo) foram coletados para realização das análises bioquímicas descritas a seguir.

3.2. Evolução temporal do ganho de peso e consumo de ração e água.

Foram realizadas estimativas semanais do ganho de peso, consumo de ração e ingestão de líquido pelos animais dos quatro grupos experimentais. Os resultados foram expressos em gramas (g) de ganho de peso e consumo médio de ração e em mililitros (ml) de ingestão de líquido pelos animais de cada grupo experimental.

Objetivo: Avaliar o efeito do consumo de etanol em binge sobre o ganho de peso, consumo de líquido e ração.

3.3. Ensaios bioquímicos.

3.3.1. Determinação das concentrações plasmática e tecidual de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

A dosagem foi realizada seguindo as instruções do fabricante do kit (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Michigan, EUA - 10009055). Para isso, o sangue foi coletado em seringas heparinizadas e centrifugado a $6500 \times g$ por 15 min a $4^\circ C$ para a separação do plasma. As alíquotas de tecido cardíaco foram homogeneizadas em tampão de lise adicionado de inibidor de protease e centrifugados ($1600 \times g$ por 10 minutos a $10^\circ C$). Em seguida, 25 μl do sobrenadante ou do plasma foram adicionados a um eppendorf de 2 ml para iniciar a reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA). O malondialdeído (ácido graxo poliinsaturado, produto de peroxidação lipídica) presente na amostra reage com o TBA sob alta temperatura ($90-100^\circ C$) em meio ácido, formando um produto de coloração rosa. Em todos os ensaios bioquímicos com o tecido cardíaco foi feita normalização pela concentração de proteína de cada amostra. O conteúdo protéico foi analisado pelo método de *Bronsted-Lowry* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA). Após a medida das absorbâncias (540-550nm) foram determinados os valores de TBARS em nmol/ml de plasma ou nmol/mg de proteína.

Objetivo: Avaliar se o consumo de etanol em binge aumenta a lipoperoxidação sistêmica e tecidual e a participação dos receptores AT₁ nessa resposta.

3.3.2. Determinação das concentrações plasmática e tecidual de H₂O₂.

O sangue foi coletado com seringas heparinizadas e centrifugado a 6500 × g por 15 min a 4°C para separação do plasma. Foi construída e os valores de concentração obtidos foram expressos em μM/mg proteína. As alíquotas de tecido cardíaco dos animais de cada grupo experimental foram homogeneizadas em solução de Krebs (mM): NaCl 130; KCl 4,7; KH₂PO₄ 1,18; MgSO₄ 1,17; NaHCO₃ 14,9; Glicose 5,5; CaCl₂ 1,6; pH 7,4). O homogenato obtido foi centrifugado a 10.000 xg, 4 °C por 5 min. Em seguida, o H₂O₂ foi avaliado utilizando o reagente Amplex® Red (10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine) (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, EUA - A22188). Para a montagem da placa, à cada 50 μl do sobrenadante obtido foi adicionado 50 μl 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 H₂O₂, produzindo a resorufina, produto altamente fluorescente (λexcitação 571, λemissão 585 nm). Uma curva modelo de H₂O₂ foi construída e os valores de concentração obtidos foram expressos em μM/mg proteína.

Objetivo: Avaliar se o consumo de etanol em binge aumenta a produção sistêmica e tecidual de H₂O₂ e a participação dos receptores AT₁ nessa resposta.

3.3.3. Determinação da atividade total plasmática e tecidual da SOD.

O sangue foi coletado com seringas heparinizadas e centrifugado a 6500 × g por 15 min a 4° C para a separação do plasma. As alíquotas de tecido cardíaco foram homogeneizadas em PBS pH 7,4, seguido da centrifugação do homogenato a 4.000 x g, 4°C por 12 minutos. A atividade da SOD foi determinada colorimetricamente seguindo instruções de kit comercial (#706002, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EUA). Os

resultados foram expressos em atividade da SOD U/ml.

Objetivo: Avaliar se o consumo de etanol em binge altera a atividade da SOD sistêmica e tecidual e a participação dos receptores AT₁ nessa resposta.

3.3.4. Determinação das concentrações plasmática e tecidual da glutatona reduzida (GSH).

O sangue foi coletado com seringas heparinizadas e centrifugado a 6500 × g por 15 min a 4° C para separação do plasma. As alíquotas de tecido cardíaco foram homogeneizadas em PBS pH 7,4 e a 100 µl de homogenato, ou a 100 µl de plasma, foram adicionados 100 µl de ácido tricloroacético (TCA, 12,5%), permanecendo no gelo por 30 min e centrifugado a 3.000 x g por 15 min a 4 °C. A montagem da placa foi realizada pela adição de 30 µl da amostra, 270 µl de Tris HCl. A cada poço foi adicionado 5 µl de Ácido 5,5-ditiobis (2-nitrobenzóico) (DTNB; 3,96mg DTNB em 1 ml de metanol), reagente que, quando em contato com o grupo tiol (-SH) dos grupos sulfidrílicos, produz coloração amarela, lida em espectrofotômetro a 450 nm. Os valores individuais foram interpolados em uma curva modelo de GSH e expressos em µg GSH/g tecido, ou µg GSH/ml de plasma.

Objetivo: Avaliar se o consumo de etanol em binge altera a capacidade antioxidante não enzimática sistêmica e tecidual e a participação dos receptores AT₁ nessa resposta.

3.3.5. Determinação da atividade plasmática da catalase.

O sangue foi coletado com seringas heparinizadas e centrifugado a 6500 × g por 15 min a 4° C para separação do plasma. As alíquotas de tecido cardíaco foram homogeneizadas em PBS pH 7,4, sendo que a 100 µl de homogenato de tecido aórtico, ou a 100 µl de plasma, foi adicionado 100 µL de tampão fosfato (K₂HPO₄ 0,1 M, KH₂PO₄ 0,1 M, pH 6,5) e centrifugados a 9.000 x g durante 20 min. A solução reação foi preparada pela adição de 2,5 ml de tampão TRI SEDTA, 47,3 ml de água Mili-q e

175,5 µl de H₂O₂ (30 M) e mantida em banho a 37°C. O ensaio será realizado pela adição de 20 µl do sobrenadante da amostra a 980 µl de solução reação em cubetas de quartzo e, após homogeneização, a velocidade de decomposição do H₂O₂ foi medida durante 60 segundos. Os valores de absorbância foram multiplicados por 2,5x10³, referente ao coeficiente de extinção do H₂O₂ e a diluição da amostra. Os resultados foram expressos como unidades catalase/mg proteína ou catalase/ml de plasma.

Objetivo: Avaliar se o consumo de etanol em binge altera a atividade sistêmica e tecidual da Catalase e a participação dos receptores AT₁ nessa resposta.

3.3.6. Determinação da geração de O₂⁻ pela quimioluminescência da lucigenina

O tecido foi homogeneizado em tampão fosfato pH 7,4 com a seguinte composição: 20 mM de KH₂PO₄, 1 mM de EGTA e 150 mM de sacarose. A reação foi iniciada pela adição de NAD (P) H (0,1 mM) a uma suspensão (volume final de 250 µL) contendo amostra de tecido cardíaco (50 µL do homogenato), lucigenina (5 µM) e tampão fosfato pH 7,4. Os valores de unidades relativas de luz (URL) foram obtidos a partir da subtração do valor basal (obtido por uma medida inicial da amostra, tampão fosfato mais lucigenina) pelo valor obtido da análise após adição do substrato NAD (P) H. Foram realizados 30 ciclos de leitura, utilizando-se o luminômetro Orion II Microplate Luminometer MPL4 (Berthold Detection Systems, Pforzheim, Alemanha). Os resultados foram normalizados pela concentração proteica de cada amostra e expressos como Unidades Relativas de Luz (URL) /mg de proteína (YOGI *et al.*, 2010).

Objetivo: Avaliar se o consumo de etanol em binge aumenta a produção cardíaca de ERO e a participação dos receptores AT₁ nessa resposta.

3.3.7. Western Immunoblotting

O tecido cardíaco foi rapidamente isolado, transferido para eppendorfs e congelados em nitrogênio líquido. Quarenta µg de proteína total foram submetidas à

eletroforese em gel de poliacrilamida (10%) por 1,5 horas, 100V em aparelho para mini-gel (mini Protean III, BioRad, CA, EUA). A eficácia da transferência foi verificada pela coloração vermelha de Ponceau. As proteínas foram eletricamente transferidas para membrana de nitrocelulose (bio-Rad, CA, EUA). As membranas foram incubadas em tampão tris salina (TBS-T) com Tris (10 mM), NaCl (150 mM), Tween 20 (0,02%) e leite desnatado (7%) por 1 hora para reduzir a ligação inespecífica dos anticorpos às proteínas na membrana. As membranas foram incubadas com anticorpo primário por 12 horas a 4° C. A seguir as membranas foram incubadas com anticorpo secundário ligado a *peroxidase* por 1,5 horas. Os sinais foram revelados pela exposição das membranas a solução de quimioluminescência (SuperSignalWest Pico Chemilumiscent Substrate, Pierce, IL, EUA). As bandas foram submetidas à análise densitométrica óptica. Os resultados foram normalizados pela expressão da GAPDH.

Objetivo: Avaliar se o consumo de etanol em binge altera a expressão proteica da ERK 1/2 e a participação dos receptores AT₁ nessa resposta.

4.4. Análise estatística.

Os resultados foram expressos como média \pm erro modelo da média (E.P.M.). Os resultados foram analisados por análise de variância de duas vias (*two-way ANOVA*), seguida pelo pós-teste de *Bonferroni* usando o software *GraphPad Prism*® (Graphpad Software, San Diego, CA, EUA). $P < 0,05$ foi considerado significativo.

4. RESULTADOS

4.1. Efeito do consumo de etanol em padrão *binge* sobre o peso dos animais, consumo de ração e água.

Não houve alteração do peso dos animais após tratamento com etanol em *binge* (Fig. 1A). Não foram constatadas diferenças estatisticamente significativas no consumo de ração pelos animais entre os grupos experimentais (Fig. 1B). Não houve diferença do consumo de água entre os animais dos diferentes grupos experimentais (Fig. 1C).

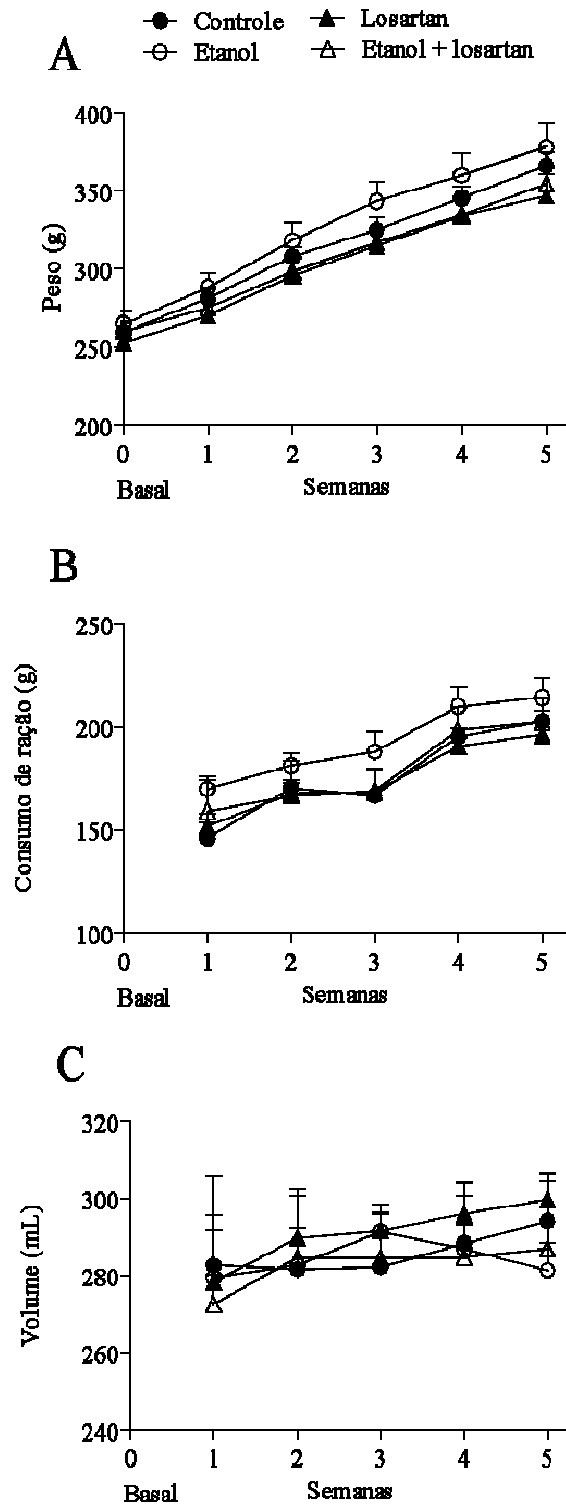


Figura 1. Efeito do consumo de etanol em padrão *binge* sobre o peso dos animais, consumo de ração e água. Os parâmetros foram avaliados semanalmente. Os pontos representam as médias do peso dos animais (A), consumo de ração (B) e líquido (C) dos animais dos diferentes grupos experimentais. Os valores representam a média \pm E.P.M. de $n=9$ animais por grupo experimental.

4.2. Avaliações plasmáticas

O tratamento com etanol em padrão *binge* não alterou a concentração plasmática de TBARS (Fig. 2).

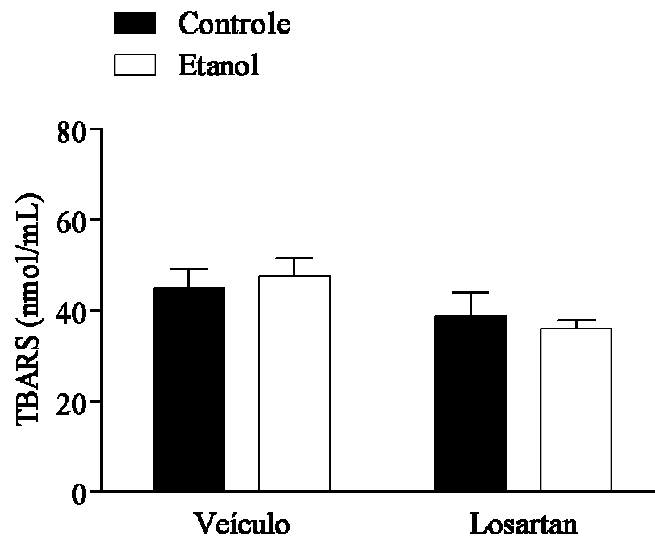


Figura 2. Efeito do consumo de etanol em padrão *binge* sobre as concentrações plasmáticas de TBARS em ratos. A concentração de TBARS foi determinada no plasma colorimetricamente. Os valores representam a média \pm E.P.M. de $n= 5$ a 7 animais.

Não foram constatadas diferenças na produção de H_2O_2 entre os grupos experimentais (Fig.3).

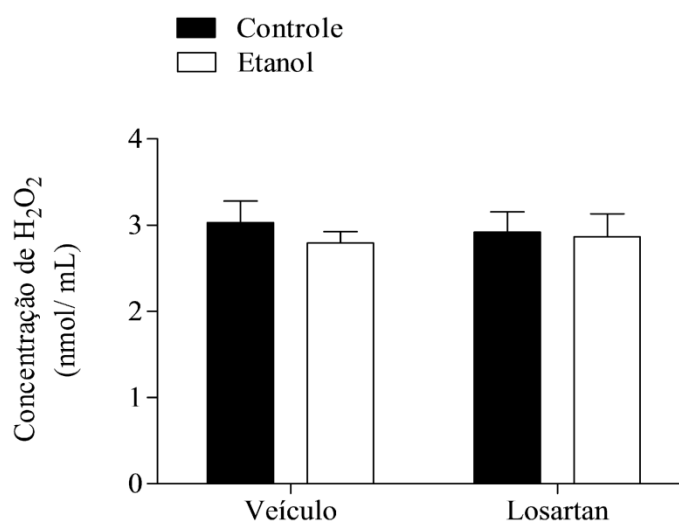


Figura 3. Efeito do consumo de etanol em padrão *binge* sobre a produção de H_2O_2 no ventrículo esquerdo de ratos. As concentrações de H_2O_2 foram avaliadas por fluorimetria. Os valores estão representados como a média \pm E.P.M. de $n= 5$ a 7 animais.

Não foram constatadas diferenças na atividade total da SOD (Fig. 4A) e da catalase entre os grupos experimentais (Fig. 4B).

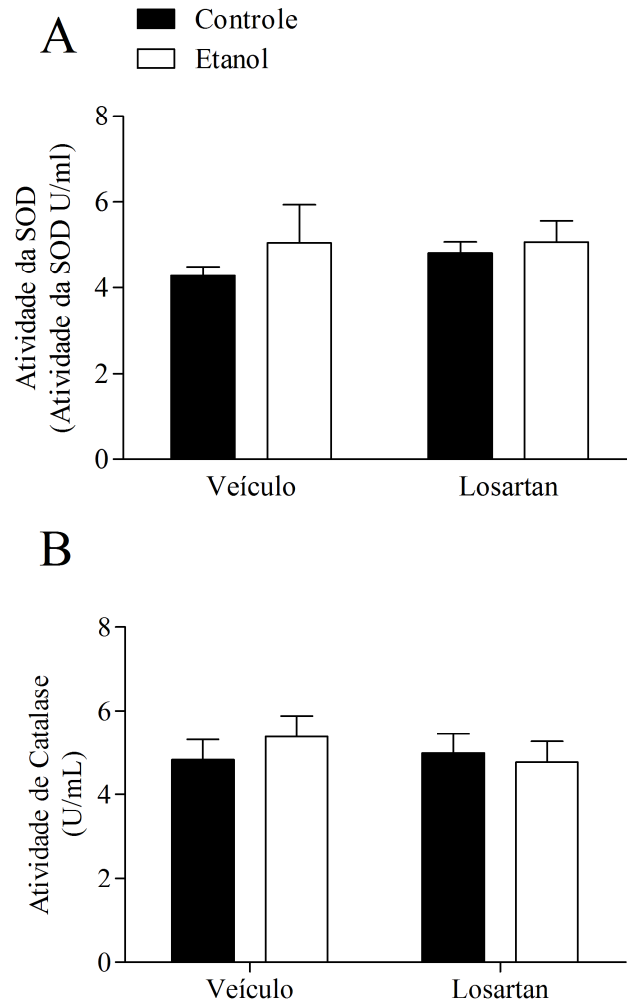


Figura 4. Efeito do consumo de etanol em padrão *binge* sobre a atividade plasmática da SOD e da catalase em ratos. As atividades da SOD (A) da catalase (B) foram determinadas no plasma por técnica colorimétrica. Os valores representam a média \pm E.P.M. de $n= 4$ a 7 animais.

Não foram constatadas diferenças na concentração de GSH entre os grupos experimentais (Fig. 5).

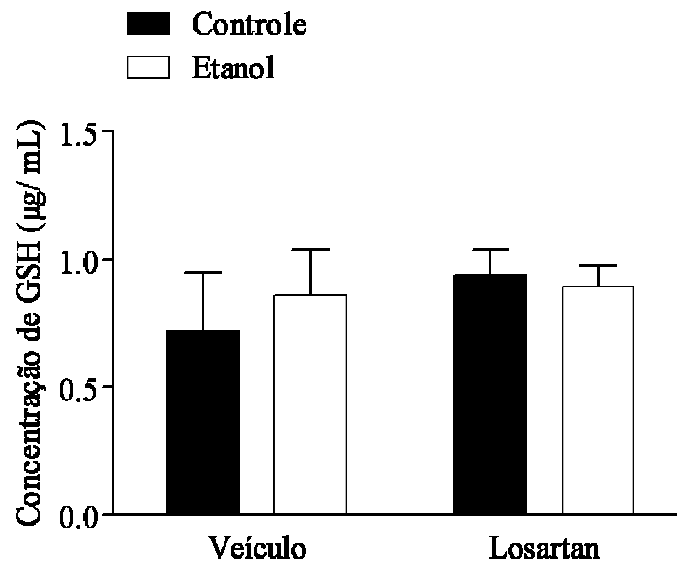


Figura 5. Efeito do consumo de etanol em padrão *binge* sobre as concentrações plasmáticas de GSH em ratos. A concentração de GSH foi determinada no plasma por técnica colorimétrica. Os valores representam a média \pm E.P.M. de $n= 5$ a 8 animais.

4.3. Avaliações cardíacas

O tratamento com etanol em padrão *binge* não afetou as concentrações de TBARS no ventrículo esquerdo. No entanto, o tratamento com losartan reduziu as concentrações de TBARS no ventrículo esquerdo de animais de ambos os grupos experimentais tratados com veículo (Fig. 6).

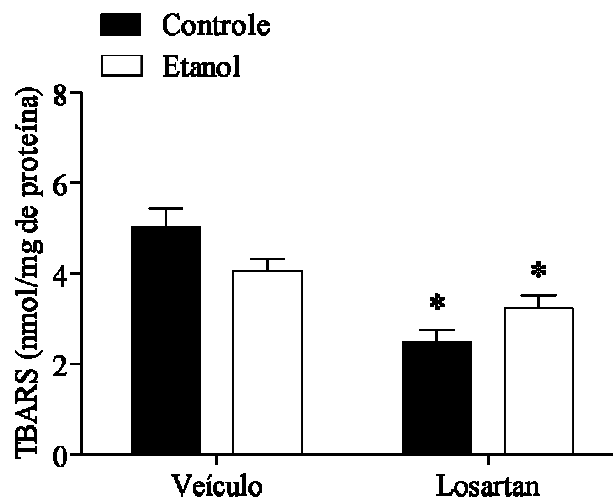


Figura 6. Efeito do consumo de etanol em padrão *binge* sobre as concentrações teciduais de TBARS em ratos. A concentração de TBARS foi determinada no ventrículo esquerdo colorimetricamente. Os valores representam a média \pm E.P.M. de $n= 5$ a 8 animais. *Comparado aos grupos controle e etanol veículo ($p<0,05$; *two-way* ANOVA).

O consumo de etanol em padrão *binge* não alterou as concentrações de $O_2^{\cdot-}$ (Fig. 7A) e H_2O_2 (Fig. 7B) no ventrículo esquerdo de ratos. No entanto, o tratamento com losartan reduziu as concentrações de H_2O_2 no ventrículo esquerdo de animais de ambos os grupos experimentais tratados com veículo.

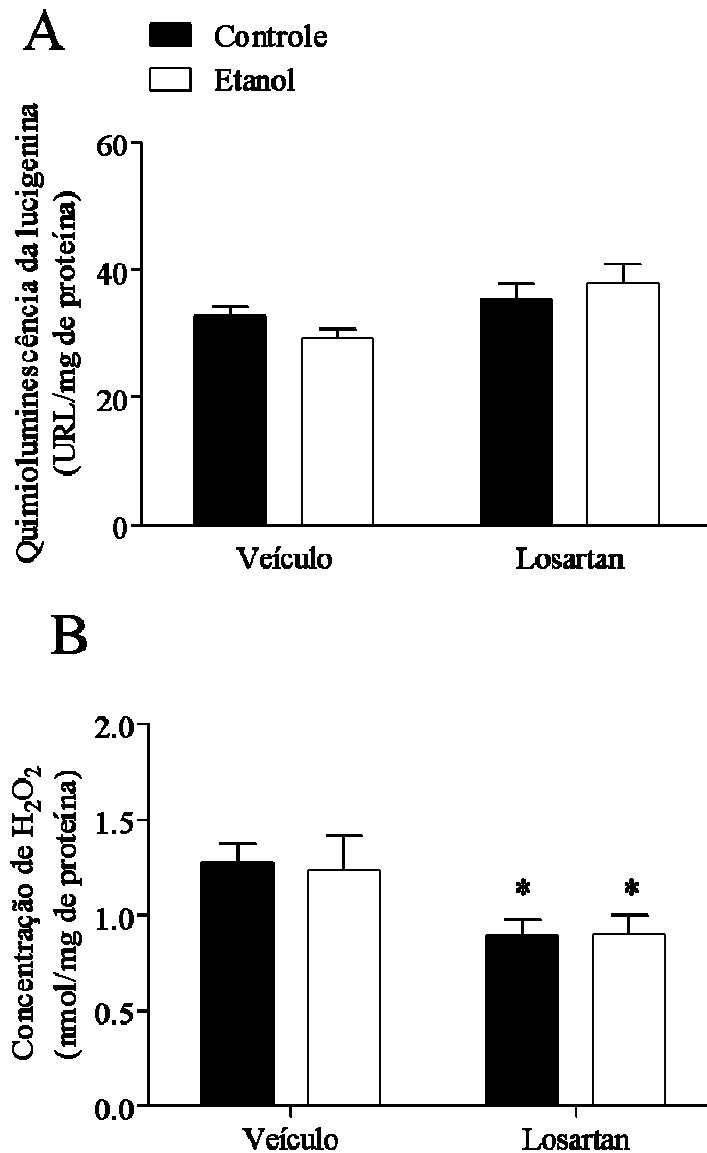


Figura 7. Efeito do consumo de etanol em padrão *binge* sobre a produção de $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 no ventrículo esquerdo de ratos. A produção de $O_2^{\cdot-}$ (A) foi avaliada pela técnica da quimioluminescência da lucigenina. As concentrações de H_2O_2 (B) foram avaliadas por fluorimetria. Os valores estão representados como a média \pm E.P.M. de $n= 5$ a 9 animais. *Comparado aos grupos controle e etanol veículo ($p < 0,05$; *two-way* ANOVA).

O tratamento com etanol em padrão *binge* não afetou a atividade total da SOD no ventrículo esquerdo. No entanto, o tratamento com losartan aumentou a atividade total da SOD no ventrículo esquerdo de animais de ambos os grupos experimentais tratados com veículo (Fig. 8).

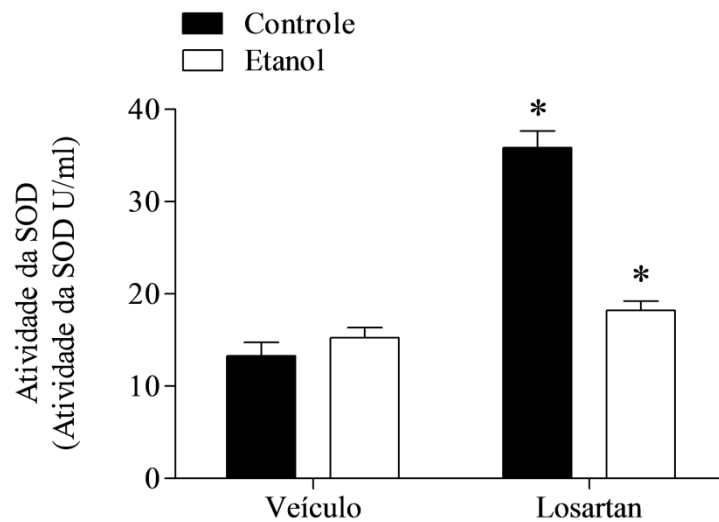


Figura 8. Efeito do consumo de etanol em padrão *binge* sobre a atividade total da SOD em ratos. A atividade total da SOD foi determinada no ventrículo esquerdo colorimetricamente. Os valores representam a média \pm E.P.M. de $n= 5$ a 8 animais. *Comparado aos grupos controle e etanol veículo e etanol+losartan ($p<0,05$; *two-way* ANOVA).

O tratamento com etanol em padrão *binge* não afetou as concentrações de GSH no ventrículo esquerdo. No entanto, o tratamento com losartan aumentou as concentrações de GSH no ventrículo esquerdo (Fig. 9).

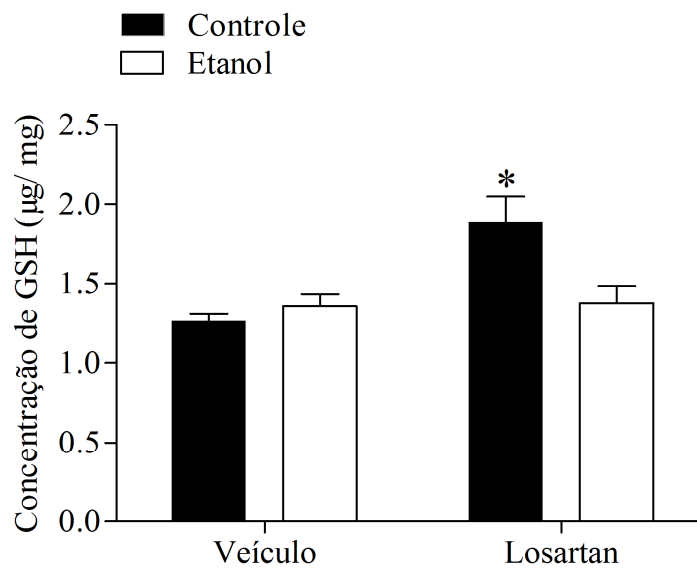


Figura 9. Efeito do consumo de etanol em padrão *binge* sobre a concentração de GSH em ratos. A concentração de GSH foi determinada no ventrículo esquerdo colorimetricamente. Os valores representam a média \pm E.P.M. de $n= 5$ a 9 animais. *Comparado aos grupos controle e etanol veículo e ao etanol + losartan ($p<0,05$; *two-way* ANOVA).

O tratamento com etanol em padrão *binge* não afetou a expressão proteica da ERK 1/2 no ventrículo esquerdo de ratos (Fig 10).

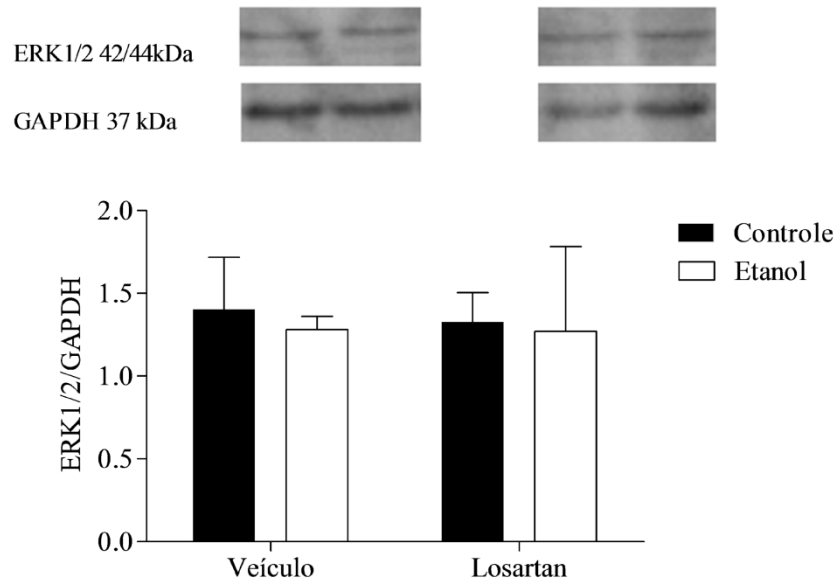


Figura 10. Efeito do consumo de etanol em padrão *binge* sobre a expressão proteica ERK 1/2 em ventrículo esquerdo de ratos. *Painel superior:* imagens representativas da expressão da ERK 1/2 obtidas por *Western Immunoblotting*. *Painel inferior:* gráfico de barras demonstrando os valores expressos pela média \pm E.P.M. da densidade óptica relativa das referidas proteínas ($n= 3$ a 4 animais).

5. DISCUSSÃO

O presente estudo empregou um modelo de tratamento animal com gavagem de etanol a 26% (2g/kg/dia) diluído com água, por quatro dias da semana (sexta-feira, sábado, domingo e segunda-feira) seguidos de 3 dias de abstinência (terça-feira, quarta-feira e quinta-feira) durante cinco semanas, sendo considerado um padrão de consumo denominado *Binge Drinking*. O modelo experimental foi delineado com base nos trabalhos de Gu *et al.* (2012), Sabino *et al.* (2013) Brancato *et al.* (2018), Jeanblanc *et al.* (2018), Satta *et al.* (2018) e Zhao *et al.* (2018). Porém, estes estudos foram desenvolvidos utilizando tempo de tratamento e/ou concentrações de etanol diferentes.

O etanol é um componente calórico que fornece 7,1 Kcal/g de energia na oxidação do etanol, na qual, apresenta-se como uma substância de valor energético capaz de alterar o peso corporal devido a sua capacidade de ativar outras vias metabólicas gerando um desequilíbrio na produção de gorduras (LIEBER, 1991; SEITZ e SUTER, 1994; SUTER *et al.*, 1997; VADSTRUP *et al.*, 2003; KACHANI *et al.*, 2008; PIMENTEL e BRESSAN, 2010). Estudos realizados em nosso laboratório com exposição crônica ao etanol a 20% por 5 a 12 semanas comprovaram o que já havia sido verificado em humanos (WILSNACK *et al.*, 1997), ou seja, a redução do ganho de peso associado a menor consumo de alimento e água (TIRAPELLI *et al.*, 2008; PASSAGLIA *et al.*, 2015; MARCHI *et al.*, 2016; DO VALE *et al.*, 2018). Resultados semelhantes foram encontrados em estudos experimentais anteriores (CHAN *et al.*, 1985; LAURE-ACHAGIOTIS *et al.*, 1990; GILL *et al.*, 1996; MACIEIRA *et al.*, 1997; STEWART e KENEDY, 1999; AGUIAR *et al.*, 2004). Estudos clínicos e experimentais com consumo crônico de etanol demonstram também que a alteração de peso leva à desnutrição de modo que há substituição de calorias fornecida pelos alimentos e alteração nas taxas de glicose circulantes pela bebida alcoólica, com alteração perceptível do peso corpóreo sugerindo modificações no metabolismo dentre eles a má absorção (MEZEY, 1980; SEITZ e SUTER, 1994). Porém, o tratamento realizado com etanol em padrão *binge* não afetou o ganho de peso dos animais. Contudo, foi descrito que indivíduos que consumiram bebida alcoólica no padrão *binge* apresentaram sobrepeso, porém o tempo de consumo etanólico não foi descrito pelos autores (KACHANI *et al.*, 2008). A alteração do peso corporal está diretamente relacionada a vários fatores como o padrão de consumo, o tipo de bebida e frequência (VALÉRIO *et al.*, 2016), os quais podem resultar em desequilíbrio hormonal, no metabolismo e no

apetite (OLIVEIRA *et al.*, 2014), podendo justificar a ausência de alteração no peso dos animais tratados neste estudo. Uma vez que não houve perda de peso em nosso modelo, podemos concluir que possíveis alterações no balanço redox não seriam decorrentes da subnutrição induzida pelo consumo de etanol em padrão *binge*.

Os distúrbios endocrinometabólicos provenientes do consumo excessivo de etanol promovem inúmeras consequências para a saúde, tais como, imunossupressão, redução da absorção intestinal de nutrientes, desenvolvimento de doenças crônicas, como a hipertensão arterial e entre outros (PREEDY e RICHARDSON, 1994; COOK, 1998; RAJENDRAM e PREEDY, 2005). Além disso, distintos fatores estão associadas as disfunções moleculares desencadeadas por vários fenômenos conhecidos, dentre eles, o Estresse Oxidativo que pode ser particularmente importante, o qual, tem capacidade de produzir oxidação de componentes biológicos e desequilíbrio nas quantidades de moléculas pró - oxidantes e antioxidantes (DAS e VASUDEVAN, 2007).

Na literatura científica há vários estudos que demonstram que o consumo crônico de etanol promove o estresse oxidativo sistêmico e tecidual (MARCHI *et al.*, 2016; PASSAGLIA *et al.*, 2015; DO VALE *et al.*, 2018). O estresse oxidativo sistêmico pode indicar estresse oxidativo tecidual, resultante do dano oxidativo celular com liberação de substâncias tóxicas no plasma, além dos próprios oxidantes e antioxidantes formados ou já presentes no ambiente sistêmico (FREI *et al.*, 1988; RICE-EVANS e MILLER, 1994; GÖNENÇ *et al.*, 2001). Assim, o etanol apresenta-se como um importante fator de risco no desenvolvimento de doenças sistêmicas como, por exemplo, a hipertensão arterial que afeta vários tecidos, além do coração e dos rins (HUSAIN *et al.*, 2004; COFFMAN e CROWLEY, 2008). Em condições patológicas foram identificadas a contribuição dessa substância na formação de radicais livres resultando em danos oxidativos em biomoléculas como lipídeos, carboidratos, proteínas e DNA (WU e CEDERBAUM, 2003). Portanto, tal fenômeno pode causar a modificação de todas as estruturas biológicas e, conseqüentemente, resultar em um mau funcionamento grave das células e tecidos.

A degradação oxidativa resultante promove a liberação de substâncias presentes nas organelas e formação de produtos tóxicos, destacando-se o malondialdeído (MDA) (MARCHI *et al.*, 2016). O ensaio plasmático de TBARS é um método muito utilizado no monitoramento da lipoperoxidação, detectando a presença dos produtos da oxidação dos ácidos graxos, principalmente, um produto secundário denominado MDA que pode

ser encontrado no plasma apresentando reatividade ao ácido tiobarbitúrico (TBA) adicionado ao meio e juntos formam o complexo MDA-TBA, posteriormente quantificado por colorimetria.

Sua detecção no plasma indica ocorrência de peroxidação lipídica e, portanto, estresse oxidativo sistêmico (LITTLE e GLADEN, 1999). No consumo crônico de etanol foi identificado o aumento das concentrações plasmáticas das moléculas pró-oxidantes tanto em estudos experimentais (SUN *et al.*, 2001; KOCH *et al.*, 2004; PASSAGLIA, 2014; MARCHI, 2016; DO VALE *et al.*, 2017; SIMPLICIO *et al.*, 2017; CERON *et al.*, 2018), quanto clínicos (VENDEMIALE *et al.*, 1989; GIORDANO, 2005; TAPIA-ROJAS *et al.*, 2018), na qual, foi detectado o aumento da produção de ERO. No presente estudo, as concentrações plasmáticas de TBARS não foram alteradas pelo tratamento com etanol em padrão *binge*, diferente do estudo de Artun *et al.* (2010) demonstrando que houve aumento da peroxidação lipídica em animais tratados em uma dose maior no mesmo modelo (5g/kg, 2 vezes ao dia, 3 dias), corroborando outros estudos na mesma dosagem (KIM *et al.*, 2009). Essa observação sugere que o tratamento com etanol em nosso modelo não foi suficiente para alterar o balanço redox sistêmico.

No entanto, o consumo excessivo de etanol potencializa a ativação do receptor AT₁ e do complexo enzimático NAD (P) H oxidase (GIUSTARINI *et al.*, 2009) formando o radical livre primário, o O₂^{•-} em concentrações suprafisiológicas. Contudo, o mesmo não pode ser detectado em plasma, pois o complexo enzimático se encontra na superfície de membranas celulares e somente ensaios teciduais podem quantificar a sua atividade. Nesse sentido, tanto a atividade dessa enzima quanto a produção deste radical livre podem ser identificados indiretamente através dos ensaios plasmáticos e teciduais sobre a atividade da enzima SOD.

De fato, a produção de ERO é controlada por sistemas antioxidantes enzimáticos como a SOD. As enzimas SOD de Cu/ Zn/ Mg encontradas no citoplasma, mitocôndrias e meio extracelular, são as principais enzimas antioxidantes, enquanto as metalotioneínas (MTs) são os antioxidantes não enzimáticos mais importantes, juntamente com a glutatona (GRASSELLI *et al.*, 2014).

Identificada em 1969, a SOD é a primeira linha de defesa contra as ERO contribuindo na formação de H₂O₂. No consumo crônico do etanol, a atividade plasmática da SOD apresentou-se diminuída no estudo de Husain *et al.* (2004). Em

contrapartida, Kubota *et al.* (1985) demonstraram em estudo clínico que o consumo abusivo de etanol aumentou a atividade plasmática da SOD. Neste presente estudo, não houve alteração da SOD em animais tratados com etanol em padrão *binge*, sugerindo que o aumento da atividade da SOD não está relacionado à prevenção do estresse oxidativo sistêmico. Em um estudo foi identificada a diminuição da atividade plasmática da SOD em animais expostos ao etanol em *binge* (5 g/ kg, 2 vezes ao dia, 3 dias) (ARTUN *et al.*, 2010). Nosso resultado sugere que não foi possível identificar alteração significativa da produção de $O_2^{\cdot-}$ em uma dose menor que o estudo citado anteriormente, por consequência, ausência de estresse oxidativo sistêmico.

Além disso, a SOD pode ser de difícil detecção no meio plasmático devido à alta probabilidade (4 vezes) de o $O_2^{\cdot-}$ ser sequestrado pelo óxido nítrico (NO) presente especialmente nos vasos sanguíneos e pela sua agilidade em dismutar o $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 , ou de ser convertido em outros produtos tóxicos como o radical hidroxil (OH^{\cdot}) por via de Fenton, ou troca de elétrons por meio da reação de Haber-Weiss (D'ORIA *et al.*, 2020). É importante lembrar que o $O_2^{\cdot-}$ é muito instável e rapidamente se liga a uma biomolécula (lipídeos, carboidrato, proteína ou DNA) em busca de um elétron para atingir estabilidade, apresentando-se com 8 elétrons (FERREIRA e MATSUBARA, 1997). Contudo, para nos certificarmos desse resultado seguimos com experimentos complementares.

O H_2O_2 é uma ERO não radicalar, mais estável e menos tóxica que o $O_2^{\cdot-}$ que atinge preferencialmente, proteínas e ácidos nucleicos. O $O_2^{\cdot-}$ produzido através de tais fontes citadas anteriormente, em especial pela NAD (P) H oxidase, é espontânea ou enzimaticamente convertido em H_2O_2 e deve ser removida, pois torna-se responsável pela formação de OH^{\cdot} , assim como o $O_2^{\cdot-}$, uma ERO potencialmente citotóxica que está associado a peroxidação lipídica e demais danos moleculares (KIM *et al.*, 2009). A formação do H_2O_2 depende da atividade da SOD e o aumento nas suas concentrações plasmáticas indicam indiretamente maior formação de $O_2^{\cdot-}$ e conseqüentemente maior atividade da SOD que, com isso, torna o ambiente sistêmico menos oxidante. No consumo crônico de etanol não foram encontradas alterações significativas na concentração plasmática de H_2O_2 (PASSAGLIA *et al.*, 2015), assim como, no presente estudo, o qual, detectamos que não houve alteração estatisticamente significativa entre os grupos tratados com etanol em padrão *binge*.

A ausência de resultados sobre a detecção do H_2O_2 é justificada pela não

observação do aumento da atividade plasmática da SOD e das concentrações de TBARS realizadas anteriormente. Sugere-se que o H_2O_2 pode ter se reduzido a OH^- e a rápida conversão dos mesmos realizada por outros antioxidantes como pela atividade da catalase e o ciclo das glutations (FERREIRA e MATSUBARA, 1997). Nesse sentido, o aumento da atividade deste antioxidante poderia ter prevenido o aumento do estresse oxidativo sistêmico em nosso modelo e tais alterações não foram observadas, corroborando estudos disponíveis na literatura. Porém, com o intuito de encontrar novas possibilidades para o nosso estudo, realizamos avaliações da atividade plasmática da enzima catalase, bem como, das concentrações plasmáticas de GSH.

A catalase é uma enzima que tem como função realizar a decomposição de H_2O_2 em O_2 e H_2O sendo encontrada no citoplasma de células dos mais variados tecidos e tal mecanismo foi descrito desde 1928 por Willians, que identificou a enzima e sua ação no tecido hepático; em 1938, Keilin e Hartree, e em 1949, George; identificaram em outros tecidos. É importante lembrar que a detecção da atividade dessa enzima é proporcional a taxa de decomposição de H_2O_2 (TRAWCZYŃSKA, 2020). No consumo crônico de etanol foi identificada a redução da atividade plasmática da catalase (CARMIEL-HAGGAI *et al.*, 2003). Em contrapartida, estudos demonstram que pode ocorrer o aumento da atividade da catalase nessas condições (HUSAIN e SOMANI, 1998). Neste presente estudo, o consumo de etanol em padrão *binge* não afetou a atividade plasmática da catalase sugerindo que não houve aumento da produção de radicais livres, especialmente o H_2O_2 , tampouco a alteração do estresse oxidativo sistêmico corroborando os ensaios plasmáticos anteriores.

Estudos mostram que o consumo de etanol pode aumentar a atividade de enzimas antioxidantes e tal fato seria decorrente de uma resposta compensatória do organismo para controlar o estresse oxidativo (MARCHI *et al.*, 2016). Com isso, de modo compartilhado, a conversão de H_2O_2 também pode ser realizado pelo ciclo das glutations.

A glutaciona reduzida (GSH) é um antioxidante não enzimático, que assim como a catalase apresenta a função importante de remover o H_2O_2 resultando na formação de GSSG (glutaciona oxidada) e H_2O . A razão GSH/ GSSG é utilizada para medir o estado redox intracelular, na qual, as glutations possuem papel central na detoxificação celular e a depleção de GSH indica um intenso estresse oxidativo (CNUBBEN *et al.*, 1996). Estudo experimental demonstrou que o consumo crônico de etanol promoveu a

depleção de GSH (KHAN *et al.*, 2012). Entretanto, um estudo clínico encontrado demonstra que as concentrações plasmáticas de GSH apresentaram-se aumentadas, assim como, as concentrações plasmáticas de GSSG (VENDEMIALE *et al.*, 1989). No presente estudo não houve alteração significativa da GSH indicando que não houve alteração da produção de H₂O₂ e, portanto, não foi possível identificar o estresse oxidativo sistêmico.

De fato, o órgão responsável pela oxirredução dos xenobióticos como o etanol é o fígado, pois suas unidades morfofuncionais, os hepatócitos, possuem um sistema enzimático complexo constituído especialmente pelo álcool *desidrogenase* e aldeído *desidrogenase* resultando na formação de acetato utilizado para a geração de energia pelo ciclo de *Krebs* (RANG & DALE, 2016). Todavia, estudos revelam que a exposição excessiva ao etanol promove o aumento da oxidação de etanol no fígado, ativando além dos sistemas enzimáticos citados acima, as vias secundárias como o sistema oxidante de etanol microssomal (MEOS) (TAKAHASHI *et al.*, 1992), desencadeando uma injúria tecidual local, de modo, que potencializa a liberação de substâncias tóxicas como o MDA e formação de radicais livres no tecido hepático detectados nos fluídos sanguíneos produzindo o estresse oxidativo (LIEBER, 1996; CEDERBAUM *et al.* 2009; KIM *et al.*, 2009). Sugere-se então, que tal fenômeno pode ser avaliado por via sistêmica através do dano oxidativo que ocorre mais intensamente nesse tecido.

Com isso, uma fração importante dessas substâncias detectadas no plasma, provém do tecido lesado que apresenta alto potencial de produzir a doença hepática alcoólica e cirrose hepática no consumo excessivo de etanol (PAN *et al.*, 2006; MINCIS e MINCIS, 2011). Um estudo clínico revelou o aumento da concentração plasmática de MDA e redução de antioxidantes endógenos como as vitaminas C e E, em amostras de pacientes portadores de doença hepática alcoólica (MASALKAR e ABHANG, 2005), corroborando o estudo realizado com pacientes diagnosticados com cirrose hepática, apresentando aumento da concentração plasmática de MDA e depleção de GSH (GALICIA-MORENO *et al.*, 2016), sugerindo estresse oxidativo sistêmico. Assim, Kim *et al.* (2009) demonstraram que animais expostos ao etanol no padrão *binge* (5 g/kg, 2 vezes ao dia, 3 dias) apresentaram aumento da concentração plasmática e tecidual de MDA, indicando que houve peroxidação lipídica em tecido hepático e o produto formado foi liberado na corrente sanguínea.

Em relação aos resultados das avaliações plasmáticas apresentadas, devemos

levar em consideração alguns fatores determinantes, como a dose e o modelo de consumo de etanol, na qual, em nosso estudo foi realizado com etanol a 2 g/kg/dia. Contudo, o estresse oxidativo plasmático ficou mais evidente a uma dosagem de 5 g/kg realizadas duas vezes ao dia como citado anteriormente, pois assim os tecidos sofrem maior agressão do estresse oxidativo tecidual instalado liberando os produtos tóxicos detectados.

Outro fator que deve - se levar em conta é a capacidade que o organismo como um todo ou um tecido específico possui de restabelecer o equilíbrio das moléculas pró - oxidantes e antioxidantes no estresse oxidativo de caráter transitório, ou seja, apresentando intervalos de abstinência permitindo a recuperação do mesmo, como mostra o estudo de Gu *et al.* (2012), na qual, foi observado alteração da pressão arterial após 90 minutos de exposição ao etanol em padrão *binge* e após 24 horas a mesma encontrava-se normalizada. No final das 5 semanas de tratamento, esta alteração também não foi observada. Com isso, sugere-se que houve o restabelecimento desse parâmetro após a remoção significativa da substância no organismo assim como de seus efeitos. A associação entre a hipertensão arterial e a exposição excessiva de etanol com aumento da produção de ERO é bem fundamentada na literatura (PASSAGLIA *et al.*, 2015; DO VALE *et al.*, 2018).

Logo, o modelo de consumo e a dose de etanol utilizada são consideradas fatores determinantes para as alterações do balanço redox induzidas pelo etanol, onde alterações mais evidentes do estresse oxidativo são observados em estudos que empregam além de doses maiores de etanol, períodos prolongados de exposição. Nesse sentido, essa pode ser a possível explicação para o fato de que o consumo de etanol em padrão *binge* não tenha aumentado o estresse oxidativo sistêmico.

Nos modelos de exposição crônica ao etanol, o animal tem como única opção líquida de consumo, uma solução de etanol diluída em água, sendo a ingestão voluntária dessa substância diária de aproximadamente 5 g/ kg/ dia (PASSAGLIA *et al.*, 2015; DO VALE *et al.*, 2018), na qual, pode ser observado o estresse oxidativo plasmático, detectado com aumento significativo de MDA (aprox. 200%), em concentrações de etanol que variam de 20 a 30 %, num período de 6 a 12 semanas e redução da capacidade antioxidante plasmática (HUSAIN e SOMANI, 1998; HUSAIN *et al.*, 2004; FAREMI *et al.*, 2008).

O que podemos observar é que o estresse oxidativo sistêmico pode se tornar

crônico na ocorrência do excesso de atividade que o fígado e demais tecidos possuem para removerem o próprio etanol e os efeitos deletérios por ele promovidos. O etanol é rapidamente absorvido desde a mucosa oral até o intestino delgado e distribuído através dos vasos sanguíneos atingindo um equilíbrio em todos os tecidos. Na metabolização hepática, o processo depende do modelo de exposição e dose, ativando os complexos enzimáticos, com liberação de metabólitos hidrofílicos seguida da excreção por via renal (RANG & DALE, 2016). Um organismo exposto a altas doses de etanol pode demorar horas ou até mesmo dias para remover a substância, de modo, que se o indivíduo consome cronicamente o etanol esse processo pode nunca cessar e falir o sistema hepático desencadeando inflamação, migração fagocitária, fibrose tecidual e por fim, apoptose (BRUNTON *et al.*, 2018) diferente do padrão *binge* que apresenta períodos de abstinência, promovendo menores danos teciduais a curto prazo. Porém, estudos recentes mostram que não somente o fígado sofre tais processos deletérios promovidos pelo etanol e esse fato vem sendo bastante explorado na literatura. Contudo, os efeitos deletérios que afetam as biomoléculas inerentes à metabolização hepática também precisam ser observados com mais atenção, como por exemplo, a ativação do sistema renina angiotensina, o aumento da produção de ANG II com consequente ativação do receptor AT1/ complexo NADP (P) H *oxidase* resultando em aumento da produção de ERO em diferentes intensidades sobre os diversos tecidos (PASSAGLIA *et al.*, 2015; DO VALE *et al.*, 2018).

Logo, observa-se também que o estresse oxidativo sistêmico pode ter caráter transitório permitindo ao organismo o restabelecimento das biomoléculas lesadas pela ação dos antioxidantes endógenos. Um estudo sugere que mesmo após o etanol ser metabolizado em grande quantidade, aparentemente, seus efeitos iniciais desaparecem após algumas horas, mantendo apenas os efeitos moleculares que necessitam de uma dose maior e mais tempo para ser identificados, como citado anteriormente, o exemplo da pressão arterial no padrão *binge* do estudo de Gu *et al.* (2012).

Vale lembrar que o organismo possui uma variedade de antioxidantes endógenos e que podem ser adquiridos na dieta, tais como as vitaminas A, C, D e E; compostos minerais, como selênio e zinco; compostos fenólicos, como catecol e vanilina; que atuam de forma que impedem a perpetuação do estado oxidativo. Assim, o equilíbrio entre a formação e a remoção de espécies reativas devem ser reguladas de forma que as reações e processos metabólicos dependentes das mesmas possam ocorrerem em um nível

adequado para manter a fisiologia das células (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

Estudos exploram as ações de demais antioxidantes como o losartan (PASSAGLIA *et al.*, 2015) – bloqueador do receptor AT₁ - reduz a formação de ERO, como a apocinina (MARCHI *et al.*, 2016) – inibidor da NAD (P) H oxidase -, na qual, permite o compartilhamento de um elétron, impedindo a formação de ERO; como a vitamina C (BIANCHI e ANTUNES, 1999), impedindo a ação do superóxido uma ERO altamente reativa com ação varredora, a glutathiona *peroxidase* (GPx), na qual, reconstitui molécula GSSG em GSH apresentando função de reparo (SCHÄFER e WERNER, 2008) e a melatonina - aumenta a eficiência da fosforilação oxidativa mitocondrial (ACUNA CASTROVIEJO *et al.*, 2011).

Para minimizar os efeitos da produção de ERO, vários fármacos vêm sendo desenvolvidos para restabelecer o equilíbrio e atenuar os efeitos oxidativos sobre as biomoléculas e conseqüentemente, o estresse oxidativo sistêmico e tecidual. Dentre elas, o losartan vem recebendo maior atenção dos autores (DAL-ROS *et al.*, 2010; YOGI *et al.*, 2012). Contudo, muitos estudos relatam os seus efeitos na redução de geração de ERO e aumento na capacidade antioxidante através do bloqueio seletivo do receptor AT₁ (SLEEM *et al.*, 2014; PASSAGLIA *et al.*, 2015).

O losartan é um anti-hipertensivo da classe dos Bloqueadores dos Receptores de Angiotensina II (BRA II), especificamente o receptor AT₁ e apresenta propriedades antioxidantes sistêmicas e teciduais perpetuando seus efeitos sobre todos os tecidos, sobretudo no sistema cardiovascular (BRUNTON *et al.*, 2016). Nesse sentido, utilizamos o tecido cardíaco para avaliar se o mesmo perfil de resposta poderia ocorrer no modelo de administração em padrão *binge*. Pois, utilizando modelo crônico de administração observamos em nosso laboratório que as alterações induzidas pelo etanol são dependentes do tecido em estudo e não necessariamente observadas no plasma (MARCHI *et al.*, 2016; SIMPLICIO *et al.*, 2017).

Como podemos observar, o estresse oxidativo tecidual induzido pelo etanol pode ocorrer em qualquer órgão do sistema (SQUADRITO e PRIOR, 1995; SOUZA JR *et al.*, 2005). Os trabalhos não têm condições de apontar se seus efeitos são semelhantes nos mais diversos tecidos devido a diferenças de metodologias aplicadas. Contudo, sugere-se que os efeitos podem depender do local onde esse fenômeno é produzido e a extensão do dano tecidual em um determinado tecido seria diferente do outro, e tal fato, está associado à função específica que o órgão exerce e aos mediadores endógenos ali

presentes mais susceptíveis a algum mecanismo específico que o etanol pode desencadear, como a ativação do sistema renina angiotensina nos diferentes tecidos como cérebro, coração e rins (PEACH, 1977; SIES, 2000; PAUL *et al.*, 2006). Diferentes técnicas laboratoriais estão disponíveis para a detecção do estresse oxidativo tecidual e isso pode dificultar uma possível comparação sobre a extensão dos danos entre os diferentes tecidos. Essa temática é pouco explorada na literatura científica, mas vamos seguir com esse raciocínio.

Por exemplo, o fígado - o órgão responsável pelo metabolismo dessa substância - pode ser o tecido mais afetado que os outros, como o cérebro, o coração, os vasos sanguíneos, os pulmões, os rins e os músculos - órgãos que são mais expostos ao etanol no processo da distribuição - e órgãos que aparentemente não se encaixam em nenhuma dessas duas situações - como a pele, os ossos, os testículos e os ovários (BRUNTON *et al.*, 2016; RANG & DALE, 2016). Com base nos dados citados, supõe-se que além do tipo de tecido exposto, o modelo de consumo e o tempo de exposição, não somente ao etanol como também de seus efeitos deletérios, podem ter grande influência no desenvolvimento de estresse oxidativo sistêmico e tecidual promovendo doenças, especialmente hepáticas e cardiovasculares (KIM *et al.*, 2009; GU *et al.*, 2012).

Por outro lado, Yao *et al.* (2007) demonstram que animais expostos cronicamente ao etanol apresentaram aumento de MDA em tecidos como fígado, coração, rins e testículos induzindo a uma depleção significativa de GSH e inativação de enzimas antioxidantes SOD e catalase. Com isso, conclui-se que além do tecido hepático, demais tecidos também podem desenvolver o estresse oxidativo, especialmente no sistema cardiovascular.

Todavia, estudos demonstram que o ventrículo esquerdo (VE) apresenta-se como a estrutura cardíaca mais afetada pela exposição excessiva dessa substância e responsável por uma condição que acomete indivíduos constantemente expostos pelo etanol conhecida por cardiomiopatia alcoólica (RAJZER *et al.*, 2004; GU *et al.*, 2012). O VE recebe um grande volume de sangue proveniente do átrio esquerdo contendo etanol absorvido após a exposição e sua função é ejetá-lo com sua grande força de contração em direção à aorta e distribuí-lo para todos os tecidos (RANG & DALE, 2016). No entanto, vários fatores contribuem para o desenvolvimento de cardiomiopatia alcoólica, como estresse oxidativo e nitrativo, hipertrofia miocárdica, formação de aduto de proteínas acetaldeído, apoptose, aumento da ativação da sinalização dos receptores

da ANG II e remodelamento fibrótico (PIANO e PHILLIPS, 2014).

O coração é um tecido complexo e muito explorado na literatura. Porém, a descoberta de que tal tecido pode apresentar seu próprio sistema renina angiotensina, com produção própria de todos os endógenos envolvidos nesse sistema é fruto da discordância entre inúmeros autores. Contudo, apesar de vários embates entre os estudiosos sobre o assunto, estudos revelam que os cardiomiócitos apresentam produção autócrina e parácrina de ANG II, assim como, alta densidade de receptores AT₁ com papéis importantes para a homeostase cardiovascular e tal fato hoje é bem fundamentado na literatura (DE MELLO e DANSER, 2000; SANTOS *et al.*, 2000).

Além disso, estudos mostram que a exposição excessiva ao etanol pode ser um potente ativador de ambas as situações, não surpreendentemente, resultar em efeitos sobre tal tecido de modo que compromete a sua função a médio ou longo prazo (MAUL *et al.*, 2005). Inclusive, vale lembrar que estudos experimentais com losartan comprovam tal hipótese por demonstrar menor comprometimento cardíaco no consumo excessivo do etanol (CHENG *et al.*, 2006).

A exposição excessiva ao etanol ativa o SRA/ AT₁ nos cardiomiócitos desencadeando a ativação do complexo enzimático NAD (P) H *oxidase* resultando em maior produção de ERO (XU e LI, 2015). Com isso, realizamos os mesmos ensaios feitos no plasma sanguíneo com o objetivo de observar as alterações promovidas pelo etanol no padrão *binge* no estresse oxidativo tecidual em VE de ratos tratados com etanol *binge* 26% (2 g/kg/ dia) e losartan (10 mg/kg/dia).

Inicialmente realizamos o ensaio tecidual de TBARS que tem o mesmo objetivo do ensaio plasmático que é a detecção do estresse oxidativo, só que nesse caso, buscamos identificar o estresse oxidativo nos cardiomiócitos do VE. No estudo de Ribiere *et al.* (1992) não foi detectado alterações nas concentrações teciduais de TBARS no miocárdio de ratos expostos cronicamente ao etanol, corroborando outro estudo onde a concentração de TBARS em tecido renal apresentou-se inalterada no tratamento com etanol (5 g/kg, 2 vezes ao dia, 3 dias) (JURCZUK *et al.*, 2004).

Contudo, Ojeda *et al.* (2012) identificaram uma redução significativa da peroxidação lipídica em tecido cardíaco de animais tratados com etanol 30 a 35%, confrontando estudos experimentais (etanol a 20%) realizados em tecido aórtico (MARCHI *et al.*, 2016; DO VALE *et al.*, 2018), hepático (5g/kg) (CHEN *et al.*, 2000; JURCZUK *et al.*, 2004) e no pâncreas (5 g/kg) (REN *et al.*, 2016), na qual, foi

identificado o aumento significativo da concentração tecidual de MDA. Em nosso estudo, observamos que as concentrações teciduais de TBARS não foram alteradas pelo tratamento em padrão *binge*, indicando que não houve peroxidação lipídica e consequentemente ausência de estresse oxidativo tecidual. Resultados semelhantes foram encontrados no estudo de Worrall *et al.* (2000). Porém, o estudo de Kalaz *et al.* (2012) demonstrou um aumento significativo na peroxidação lipídica endógena cardíaca em animais expostos ao etanol em outro padrão de *binge* (5 g/ kg, 2 vezes por dia, 3 dias).

Assim, ao realizarmos uma observação isolada sobre esse marcador, podemos detectar que os tecidos cardíacos dos animais expostos a doses maiores (30 a 35%) do etanol resultaram em redução da concentração de TBARS, enquanto que, os tecidos renais e cardíacos em doses menores (5 g/kg) se apresentaram inalterados e as mesmas doses em tecidos vascular e hepático refletiram em aumento da concentração de MDA. Como discutido anteriormente, os vasos sanguíneos assim como o tecido hepático, são constantemente expostos ao etanol e isso justificaria as alterações detectadas no consumo crônico.

No estudo do *binge*, não detectamos alterações significativas, pois, diferente do estudo de Kalaz *et al.* (2012), a nossa exposição era uma única dose de etanol por dia, de uma dose inferior (2 g/ kg/dia), com intervalo maior de abstinência (24 horas), por mais tempo de tratamento na semana (4 dias) e tais fatores apresentam-se como determinantes no desenvolvimento do estresse oxidativo tecidual. Com bases nesses dados, sugere-se que as alterações em MDA ocorre em tecidos mais vulneráveis e em um período de tempo relativamente curto sob altas doses de etanol.

O fato de que o tratamento com losartan reduziu as concentrações de TBARS em animais de ambos os grupos tratados com veículo indica que houve redução da peroxidação lipídica. Esse feito pode ser explicado pela ação antioxidante do losartan que foi descrita em diferentes tecidos (KAYABASI *et al.*, 2013; IVANOV *et al.*, 2014; PASSAGLIA *et al.*, 2015).

O complexo enzimático NAD (P) H *oxidase* é encontrado em estado inativo, mas após a estimulação celular, favorece a reação do oxigênio molecular (O_2) e o NADPH um substrato da enzima NAD (P) H *oxidase* formando o O_2^{\bullet} através de reações redox (redução e oxidação). Vale lembrar que o O_2^{\bullet} presente no tecido pode formar o peroxinitrito ($ONOO^-$) e/ou ser dismutado pela ação da enzima superóxido

dismutase (SOD) gerando o H_2O_2 que pode ser detectado em tecidos, indicando indiretamente a atividade deste complexo enzimático.

O $O_2^{\bullet-}$ é considerado como a ERO primária altamente instável sendo produzido em maior expressão pela enzima NAD (P) H *oxidase*, além de outras fontes que o produzem secundariamente em menor expressão. Com isso, utilizamos o ensaio de quimioluminescência da lucigenina nos tecidos com o objetivo de avaliar a produção de $O_2^{\bullet-}$ em nosso estudo. O objetivo deste ensaio é estimular a produção de $O_2^{\bullet-}$ por meio da adição do substrato NADPH ao meio reacional. Foram identificados aumento na atividade da NAD (P) H *oxidase* em VE no estudo experimental de Nakashima *et al.* (2019), assim como, em tecido aórtico (HUSAIN *et al.*, 2011; PASSAGLIA *et al.*, 2015; MARCHI *et al.*, 2015); DO VALE *et al.*, 2018), em leito mesentérico (PASSAGLIA *et al.*, 2015) e nos pulmões (POLIKANDRIOTIS *et al.*, 2006) de animais expostos cronicamente ao etanol em concentrações de 20 a 30%. Contudo, no presente estudo não houve aumento estatisticamente relevante da produção de $O_2^{\bullet-}$ após tratamento com etanol.

É importante lembrar que o $O_2^{\bullet-}$ por ser altamente instável, rapidamente busca uma biomolécula em busca de estabilidade e isso gera um dano para tal. Contudo, os resultados nos revelam que a possibilidade de detecção do mesmo depende de um maior tempo de tratamento resultando em maior produção deste ERO a ponto da técnica laboratorial referida detectar a produção significativa de $O_2^{\bullet-}$.

Como citado anteriormente, o $O_2^{\bullet-}$ pode rapidamente sequestrar o NO presente principalmente no leito dos vasos sanguíneos e formar o ONOO⁻. No estudo de Cao & Li (2004) foi demonstrado em um estudo *in vitro* que a exposição de etanol induziu a quebra de fitas de DNA no tecido cardíaco, um evento crítico que leva à citotoxicidade provocada sobre as biomoléculas por peroxinitrito corroborando outros estudos (KESSOVA *et al.*, 2003). Notavelmente, a nitrotirosina, um marcador de dano celular mediado pelo ONOO⁻, pode ser utilizada para avaliar indiretamente a presença do mesmo a partir da produção de $O_2^{\bullet-}$, como mostrado no estudo de Do Vale *et al.* (2018), na qual, foi detectada o aumento das concentrações de nitrotirosina em aorta de animais tratados no modelo crônico (20%). Posteriormente o ONOO⁻ liga-se a diferentes proteínas e enzimas estruturais e contráteis que contribuem para a disfunção celular subsequente.

O $O_2^{\bullet-}$ pode ser dismutado em H_2O_2 a partir da atividade da enzima SOD

também avaliada anteriormente no plasma sanguíneo. Estudos demonstram que a SOD pode ter função importante na inibição da peroxidação lipídica de células e tecidos, assim como evitar a lesão de proteínas e no DNA. A terapia exógena com SOD pode ser significativamente interessante na prevenção experimental da peroxidação lipídica (SAITOH *et al.*, 1994; SAITOH *et al.*, 2001). No consumo crônico de etanol não foi detectada alteração da atividade enzimática da SOD no tecido cardíaco (RIBIERE *et al.*, 1992; OJEDA *et al.*, 2012), assim como, em tecido aórtico (DO VALE *et al.*, 2018). Logo, um estudo de Jurczuk *et al.* (2004) demonstram um aumento da atividade da SOD em tecido renal e nenhuma alteração no tecido hepático. Assim, em nosso estudo não foi identificado alteração significativa na atividade da enzima SOD por técnica colorimétrica. Porém, o estudo de Kalaz *et al.* (2012) demonstra aumento significativo da atividade tecidual da SOD em tecido cardíaco sob um tratamento de etanol em *binge* (5 g/kg, 2 vezes ao dia, 3 dias). A atividade da SOD apresentou-se estatisticamente significativa nos grupos controle e etanol, tratados com losartan, na qual, a ação antioxidante desse fármaco ativa a enzima, de modo que permite a redução das concentrações das ERO formadas, especialmente, o H_2O_2 e $ONOO^-$, mas não de todo o estresse oxidativo.

A atividade da SOD pode ser quantificada com maior eficiência em ensaios teciduais, na qual, o *Western Immunoblotting* se mostra como uma alternativa de detecção da atividade dessa enzima em tecidos. Foi demonstrado num estudo que a expressão proteica tecidual da SOD 1, SOD 2 e SOD 3 em aorta de animais tratados com etanol a 20% não apresentaram alterações significativas confirmando o ensaio colorimétrico (DO VALE *et al.*, 2018).

Após a dismutação do $O_2^{\bullet-}$ realizado pela enzima SOD, é formada a molécula de H_2O_2 é uma ERO não radicalar mais estável que o $O_2^{\bullet-}$. Porém, cabe lembrar que se trata de um metabólito potencialmente deletério, apresentando alta toxicidade celular, resultando na formação OH^{\bullet} , uma espécie mais reativa, capaz de inativar proteínas e oxidar ácidos graxos presentes nas membranas celulares. No consumo crônico de etanol foi detectado o aumento da produção de H_2O_2 em tecido aórtico em estudo *in situ* utilizando a sonda fluorescente diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA) no estudo de Marchi *et al.* (2016). Porém a autora não obteve o mesmo resultado utilizando a técnica que utilizamos (Kit Amplex Red H_2O_2) quantificado por fluorimetria. Assim como observado para o $O_2^{\bullet-}$, o consumo de etanol em padrão *binge*

não alterou a produção de H_2O_2 . Contudo, os grupos experimentais tratados com losartan apresentaram redução tecidual da concentração de H_2O_2 no VE de ratos e essa resposta pode ser confirmada a partir de um ensaio sobre a atividade enzimática tecidual da catalase.

Vale lembrar que a enzima SOD têm como função produzir o H_2O_2 e a enzima catalase decompõe o mesmo formando uma molécula de H_2O e de O_2 . Estudo sugere que possivelmente há uma relação entre SOD/ CAT indicando que se não há alteração da atividade da SOD provavelmente não será detectada alteração na atividade enzimática da catalase (OJEDA *et al.*, 2012) como ocorreu no estudo de Do Vale *et al.* (2018) e de Marchi *et al.* (2015) em tecido aórtico na exposição crônica ao etanol a 20%. Ojeda *et al.* (2012) demonstram em estudo que foi detectado um aumento da atividade enzimática da SOD e da catalase no tecido cardíaco na exposição crônica de etanol a 30%, enquanto que, outros autores identificaram redução da SOD no mesmo tecido (ZHOU *et al.*, 2013; YAYALACI *et al.*, 2014; RAJBANSHI e PANDANABOINA, 2014). No entanto, Jurczuk *et al.* (2004) revelam que a atividade da SOD aumentou no rim mas não apresentou alteração no fígado e que a atividade da catalase diminuiu nos tecidos hepático e renal na exposição ao etanol a 5 g/kg. De fato, alguns estudos mostram que o losartan aumenta a atividade da catalase no coração sendo que essa resposta poderia ser responsável pelo efeito antioxidante desse fármaco (KHAPER e SINGAL, 2001; XU *et al.*, 2010; ASSIS *et al.*, 2020).

A GSH é um antioxidante não enzimático, responsável pela eliminação parcial do H_2O_2 . Seu ciclo é composto pelas enzimas glutathione *peroxidase* (GPx) e glutathione *reductase*, na qual, a conversão de GSH por GSSG indica intenso estresse oxidativo e a conversão de GSSG a GSH indica manutenção fisiológica do ciclo, pelas respectivas enzimas (CNUBBEN *et al.*, 1996). No consumo crônico de etanol não foi identificado alteração da concentração tecidual de GSH (KESSOVA *et al.*, 2003; MARCHI *et al.*, 2015; DO VALE *et al.*, 2018) em aortas e tecido hepático de animais tratados, assim como, não foi encontrada alteração na atividade da enzima GPx no tecido aórtico e cardíaco (OJEDA *et al.*, 2012; MARCHI *et al.*, 2015). Também não foram observadas alterações na razão GR/GPx entre os animais tratados cronicamente em tecido cardíaco (OJEDA *et al.*, 2012). Em nosso estudo não foi detectado alteração estatisticamente significativa na concentração de GSH no tecido cardíaco indicando que não houve depleção de tal elemento e estresse oxidativo tecidual assim como os demais ensaios

demonstrados anteriormente. Em contrapartida, Goc *et al.*, (2019) revelaram que o tecido hepático e o tecido renal apresentaram depleção de GSH, no qual, os camundongos foram expostos a concentrações excessivas de etanol que poderia ser classificada como *binge drinking* (5 g/kg, 2 vezes ao dia, 3 dias) confirmando a hipótese de que o estresse oxidativo é identificado em animais expostos a maiores doses e em curto período de tratamento. O fato do grupo de animais tratados apenas com o losartan ter elevado as concentrações de GSH no tecido ocorreu pelos motivos já observados, ou seja, pela sua ação antioxidante já revelada em outros tecidos.

A ativação da NAD (P) H *oxidase* e do receptor AT₁ induzidas pelo etanol pode produzir reações intracelulares resultando não somente na formação de ERO como também a fosforilação de proteínas como as proteínas cinases ativadas por mitogênio (MAPKs) que respondem a estímulos extracelulares regulando diversas ações celulares como expressão gênica, mitose, diferenciação e apoptose (RAJA *et al.*, 2017). As MAPKs estão associadas a diferentes doenças cardiovasculares e estudos demonstram que a exposição aguda, crônica e em *binge* pode ativar diferentes MAPKs, dentre elas, a MAPK ERK 1/2, uma cinase regulada por sinal extracelular (RAVINGEROVA *et al.*, 2003; AROOR e SHUKLA, 2004; GU *et al.*, 2012). Assim, o mecanismo preciso por trás da manutenção mediada pela MAPK da homeostase cardíaca e da função contrátil na exposição ao etanol permanece incerto. Em nosso estudo não houve alteração estatisticamente significativa na ativação da ERK 1/2 corroborando o estudo de Gu *et al.* (2012). Contudo, coletas teciduais realizadas após a exposição de etanol em 1 e 4 horas apresentaram aumento da ativação da ERK 1/2, indicando que o fenômeno pode ser observado na presença do etanol e que logo após a sua eliminação possivelmente os mecanismos intracelulares regulariza suas funções (AROOR e SHUKLA, 2004) como já citadas em outros biomarcadores anteriormente.

Ao analisarmos os resultados das avaliações cardíacas devemos nos atentar aos fatores como a dose do etanol e o modelo de consumo, assim como, no plasma. A suposição de que as ERO têm capacidade de influenciar o desencadeamento de doenças cardiovasculares recebeu inúmeros fundamentos científicos. Em nosso padrão de *binge* o consumo foi intervalado em 4 dias seguidos com 3 dias seguidos de abstinência por semana, de 2 g/kg/dia e esse padrão de administração pode ter influenciado a resposta ao etanol propiciando ao organismo a possibilidade de recuperação do balanço redox tecidual em relação aos efeitos deletérios do etanol. É importante ressaltar que ao

estudar o consumo de etanol deve-se levar em conta o volume e o modelo de consumo, relacionado às taxas de mortalidade e causas de doenças. Com isso, o etanol pode ser visto como um agente tóxico que atua de maneira dependente da dose consumida (FERREIRA e WILLOUGHBY, 2007; FERREIRA e WEEMS, 2008).

6. CONCLUSÃO

O consumo de etanol em padrão *binge* não promoveu aumento do estresse oxidativo sistêmico ou alteração dos sistemas de defesa antioxidante. Perfil semelhante foi observado no tecido cardíaco onde não foi detectado aumento das ERO ou lipoperoxidação após consumo de etanol.

7. REFERÊNCIAS

AGUIAR, A.S.; DA-SILVA, V.A.; BOAVENTURA, G. T. Can calories from ethanol contribute to body weight preservation by malnourished rats?. *Brazilian journal of medical and biological research*, v. 37, n. 6, p. 841-846, 2004.

ARTUN, B.C. *et al.* The effect of carnosine pretreatment on oxidative stress and hepatotoxicity in binge ethanol administered rats. *Human & Experimental Toxicology*, v. 29, n. 8, p. 659-665, 2010.

AROOR, A. R.; SHUKLA, S. D. MAP kinase signaling in diverse effects of ethanol. *Life sciences*, v. 74, n. 19, p. 2339-2364, 2004.

ASSIS, V.O. *et al.* Ethanol Withdrawal Alters the Oxidative State of the Heart Through AT1-Dependent Mechanisms. *Alcohol and Alcoholism*, v. 55, n. 1, p. 3-10, 2020.

BARRA, S. *et al.* Vascular and metabolic effects of angiotensin II receptor blockers. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, v. 10, n. 2, p. 173-189, 2009.

BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Rev Nutr*, v. 12, n. 2, p. 123-30, 1999.

BLOT, W.J. Alcohol and cancer. *Cancer research*, v. 52, n. 7 Supplement, p. 2119s-2123s, 1992.

BRANCATO, A. *et al.* Pre-conceptional and peri-gestational maternal binge alcohol drinking produces inheritance of mood disturbances and alcohol vulnerability in the adolescent offspring. *Frontiers in psychiatry*, v. 9, p. 150, 2018.

BRUNTON, L.L.; HILAL-DANDAN, R.; KNOLLMANN, B.C. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman e Gilman-13*. Artmed Editora, 2018.

BULLE, S. *et al.* Therapeutic potential of *P. santalinus* against alcohol-induced histopathological changes and oxidative damage in heart and lungs. *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*, v. 6, n. 4, p. 305-311, 2015.

CADENAS, E.; SIES H. Oxidative stress: excited oxygen species and enzyme activity. *Advances in Enzyme Regulation*, v. 23, p. 217-237, 1985.

CARMIEL-HAGGAI, M.; CEDERBAUM, A.I.; NIETO, N. Binge ethanol exposure increases liver injury in obese rats. *Gastroenterology*, v. 125, n. 6, p. 1818-1833, 2003.

CAO, Z.; LI, Y. Potent inhibition of peroxynitrite-induced DNA strand breakage by ethanol: possible implications for ethanol-mediated cardiovascular protection. *Pharmacological research*, v. 50, n. 1, p. 13-19, 2004.

CAVALCANTE, A.G.M.; BRUIN, P.F.C. O papel do estresse oxidativo na DPOC: conceitos atuais e perspectivas. *Jornal brasileiro de Pneumologia*, v. 35, n. 12, p. 1227-1237, 2009.

- CEDERBAUM, A. *et al.* Role of oxidative stress in alcohol-induced liver injury. *Archives of toxicology*, v. 83, n. 6, p. 519-548, 2009.
- CEPERO, S.M. Ozone Therapy: General protocols based on evidences. *Journal of Ozone Therapy (JO3T)*, v. 2, n. 2, p. 23-23, 2018.
- CERON, C.S. *et al.* Chronic ethanol consumption increases vascular oxidative stress and the mortality induced by sub-lethal sepsis: Potential role of iNOS. *European Journal of Pharmacology*, v. 825, p. 39-47, 2018.
- CHAN, T.C.; WALL, RICHARD A.; SUTTER, MORLEY C. Chronic ethanol consumption, stress, and hypertension. *Hypertension*, v. 7, n. 4, p. 519-524, 1985.
- CHEN, J. *et al.* Formation of malondialdehyde adducts in livers of rats exposed to ethanol: role in ethanol-mediated inhibition of cytochrome c oxidase. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, v. 24, n. 4, p. 544-552, 2000.
- CHENG, C. *et al.* Angiotensin II type 1 receptor blockade prevents alcoholic cardiomyopathy. *Circulation*, v. 114, n. 3, p. 226-236, 2006.
- CHIVA-BLANCH, G. *et al.* Effects of wine, alcohol and polyphenols on cardiovascular disease risk factors: evidences from human studies. *Alcohol and Alcoholism*, v. 48, n. 3, p. 270-277, 2013.
- CNUBBEN N.H., *et al.* (2001). The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. *Environ Toxicol Pharmacol* 10(4):141-152.
- COFFMAN, T.M.; CROWLEY, S. D. Kidney in hypertension: guyton redux. *Hypertension*, v. 51, n. 4, p. 811-816, 2008.
- COOK, R.T. Alcohol abuse, alcoholism, and damage to the immune system—a review. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, v. 22, n. 9, p. 1927-1942, 1998.
- DAL-ROS, S. *et al.* Losartan prevents portal hypertension-induced, redox-mediated endothelial dysfunction in the mesenteric artery in rats. *Gastroenterology*, v. 138, n. 4, p. 1574-1584, 2010.
- DAS, S.K.; VASUDEVAN, D.M. Alcohol-induced oxidative stress. *Life sciences*, v. 81, n. 3, p. 177-187, 2007.
- DE ALMEIDA-PITITTO, B. *et al.*, O lado saudável do consumo de bebida alcoólica. *Revista USP*, n. 96, p. 55-68, 2013.
- DE GAETANO, G. *et al.* Effects of moderate beer consumption on health and disease: A consensus document. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, v. 26, n. 6, p. 443-467, 2016.
- DE GASPARO M, CATT K.J., INAGAMI T, WRIGHT J.W., UNGER T. (2000).

International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev* 52:415-472.

DE MELLO, W.C.; DANSER, A.J. Angiotensin II and the heart: on the intracrine renin-angiotensin system. *Hypertension*, v. 35, n. 6, p. 1183-1188, 2000.

D'ORIA, R. et al. The Role of Oxidative Stress in Cardiac Disease: From Physiological Response to Injury Factor. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2020, 2020.

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

EDWARDS, G.; GROSS, M. M. Alcohol dependence: provisional description of a clinical syndrome. *British Medical Journal*, v. 1, n. 6017, p. 1058, 1976.

ELLIOTT E.J., BOWER C. Alcohol and pregnancy: the pivotal role of the obstetrician. *Aust. N. Z. J. Obstet Gynaecol.* 2008; 48:236-239.

FABIANI, M.E. *et al.* Comparative in vivo effects of irbesartan and losartan on angiotensin II receptor binding in the rat kidney following oral administration. *Clinical Science*, v. 99, n. 4, p. 331-341, 2000.

FAREMI, T.Y. *et al.* Hepatoprotective potentials of *Phyllanthus amarus* against ethanol-induced oxidative stress in rats. *Food and Chemical Toxicology*, v. 46, n. 8, p. 2658-2664, 2008.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da associação médica brasileira*, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FERREIRA, M.P.; WEEMS, M.K.S. Alcohol consumption by aging adults in the United States: health benefits and detriments. *Journal of the American Dietetic Association*, v. 108, n. 10, p. 1668-1676, 2008.

FERREIRA, M.P.; WILLOUGHBY, D. Alcohol consumption: the good, the bad, and the indifferent. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, v. 33, n. 1, p. 12-20, 2008.

FERNÁNDEZ-SOLÀ, J. The Effects of Ethanol on the Heart: Alcoholic Cardiomyopathy. *Nutrients*, v. 12, n. 2, p. 572, 2020.

FREI, B. *et al.* Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 85, n. 24, p. 9748-9752, 1988.

FREINBICHLER W., *et al.* (2011). Highly reactive oxygen species: detection, formation, and possible functions. *Cell Mol Life Sci* 68:2067-2079.

FRIDOVICH I (1997). Superoxide anion radical (O₂⁻), superoxide *dismutases*, and related matters. *J Biol Chem* 272:18515-18517.

GALICIA-MORENO, M. *et al.* Behavior of oxidative stress markers in alcoholic liver cirrhosis patients. *Oxidative medicine and cellular longevity*, v. 2016.

GEORGE, P. The effect of the peroxide concentration and other factors on the decomposition of hydrogen peroxide by catalase. *Biochemical Journal*, v. 44, n. 2, p. 197-205, 1949.

GILL, K.; AMIT, Z.; SMITH, B.R. The regulation of alcohol consumption in rats: The role of alcohol-metabolizing enzymes—Catalase and aldehyde dehydrogenase. *Alcohol*, v. 13, n. 4, p. 347-353, 1996.

GIORDANO, F.J. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 115, n. 3, p. 500-508, 2005.

GIUSTARINI, D. *et al.* Oxidative stress and human diseases: origin, link, measurement, mechanisms, and biomarkers. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, v. 46, n. 5-6, p. 241-281, 2009.

GUIRAUD, A. *et al.* Cardioprotective effect of chronic low dose ethanol drinking: insights into the concept of ethanol preconditioning. *Journal of molecular and cellular cardiology*, v. 36, n. 4, p. 561-566, 2004.

GRASSELLI, E. *et al.* Altered oxidative stress/antioxidant status in blood of alcoholic subjects is associated with alcoholic liver disease. *Drug and Alcohol Dependence*, v. 143, p. 112-119, 2014.

GRIFFITH O.W. (1999). Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radic Biol Med* 27(9/10):922-935.

GOC, Z. *et al.* Effect of taurine on ethanol-induced oxidative stress in mouse liver and kidney. *Chinese Journal of Physiology*, v. 62, n. 4, p. 148, 2019.

GONGORA, M.C., *et al.* (2006). Role of extracellular superoxide *dismutase* in hypertension. *Hypertension* 48:473-481.

GONZAGA N.A., *et al.* (2014). Acute ethanol intake induces mitogen-activated protein kinase activation, platelet-derived growth factor receptor phosphorylation, and oxidative stress in resistance arteries. *J Physiol Biochem* 70:509-523.

GÖNENÇ, A. *et al.* Plasma malondialdehyde (MDA) levels in breast and lung cancer patients. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics*, v. 26, n. 2, p. 141-144, 2001.

GRIEDLING K.K., SORESCU D., USHIO-FUKAI M. (2000). NAD(P)H *oxidase*: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 86:494-501.

GU, L. *et al.* Cardiovascular responses and differential changes in mitogen-activated protein kinases following repeated episodes of binge drinking. *Alcohol and Alcoholism*, v. 48, n. 2, p. 131-137, 2012.

- HORNIG, B. *et al.* Comparative effect of ace inhibition and angiotensin II type 1 receptor antagonism on bioavailability of nitric oxide in patients with coronary artery disease: role of superoxide *dismutase*. *Circulation*, v. 103, n. 6, p. 799-805, 2001.
- HUSAIN, K.; SOMANI, S.M. Interaction of exercise training and chronic ethanol ingestion on testicular antioxidant system in rat. In: *Journal of Applied Toxicology: An International Forum Devoted to Research and Methods Emphasizing Direct Clinical, Industrial and Environmental Applications*. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd., 1998. p. 421-429.
- HUSAIN, K. Physical conditioning modulates rat cardiac vascular endothelial growth factor gene expression in nitric oxide-deficient hypertension. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 320, n. 4, p. 1169-1174, 2004.
- HWANG, C. *et al.* The effects of repeated binge drinking on arterial stiffness and urinary norepinephrine levels in young adults. *Journal of hypertension*, v. 38, n. 1, p. 111, 2020.
- IVANOV, M. *et al.* Losartan improved antioxidant defense, renal function and structure of postischemic hypertensive kidney. *PloSone*, v. 9, n. 5, 2014.
- JEANBLANC, J. *et al.* Face validity of a pre-clinical model of operant binge drinking: just a question of speed. *Addiction Biology*, v. 24, n. 4, p. 664-675, 2019.
- JURCZUK, M. *et al.* Antioxidant enzymes activity and lipid peroxidation in liver and kidney of rats exposed to cadmium and ethanol. *Food and chemical toxicology*, v. 42, n. 3, p. 429-438, 2004.
- KACHANI, A.T. *et al.* O impacto do consumo alcoólico no ganho de peso. *Archives of Clinical Psychiatry (São Paulo)*, v. 35, p. 21-24, 2008.
- KALAZ, E. B. *et al.* Effect of binge ethanol treatment on prooxidant-antioxidant balance in rat heart tissue. *Pathophysiology*, v. 19, n. 1, p. 49-53, 2012.
- KAYABASI, H. *et al.* The effects of Losartan on oxidative stress and inflammation in non-diabetic patients undergoing chronic hemodialysis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, v. 17, n. 2, p. 235-242, 2013.
- KEILIN, D.; HARTREE, E. F. On the mechanism of the decomposition of hydrogen peroxide by catalase. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B-Biological Sciences*, v. 124, n. 837, p. 397-405, 1938.
- KETCHESIN, K.D.; STINNETT, G.S.; SEASHOLTZ, A.F. Binge Drinking Decreases Corticotropin Releasing Factor Binding Protein Expression in the Medial Prefrontal Cortex of Mice. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, v. 40, n. 8, p. 1641-1650, 2016.
- KESSOVA, I. G. *et al.* Alcohol-induced liver injury in mice lacking Cu, Zn-superoxide

dismutase. Hepatology, v. 38, n. 5, p. 1136-1145, 2003.

KHAPER, N.; SINGAL, P.K. Modulation of oxidative stress by a selective inhibition of angiotensin II type 1 receptors in MI rats. Journal of the American College of Cardiology, v. 37, n. 5, p. 1461-1466, 2001.

KHAN, I.; SINGH, V.; CHAUDHARY, A.K. Hepatoprotective activity of Pinus roxburghii Sarg. wood oil against carbon tetrachloride and ethanol induced hepatotoxicity. Bangladesh Journal of Pharmacology, v. 7, n. 2, p. 94-99, 2012.

KHAYAT A., GONDA S., SEN S., SMEBY R.R. (1981). Responses of juxtaglomerular cell suspensions to various stimuli. Hypertension 3:157-167.

KIM, S.J. *et al.* Ethanol-induced liver injury and changes in sulfur amino acid metabolomics in glutathione peroxidase and catalase double knockout mice. Journal of hepatology, v. 50, n. 6, p. 1184-1191, 2009.

KLATSKY *et al.* Alcohol use, myocardial infarction, sudden cardiac death, and hypertension. Alcoholism: clinical and experimental research, v. 3, n. 1, p. 33-39, 1979.

KOCH, O.R. *et al.* Oxidative stress and antioxidant defenses in ethanol-induced cell injury. Molecular Aspects of Medicine, v. 25, n. 1-2, p. 191-198, 2004.

KONDO, K. Beer and health: preventive effects of beer components on lifestyle-related diseases. Biofactors, v. 22, n. 1-4, p. 303-310, 2004.

KUBOTA, S. *et al.* Chemiluminescence and superoxide *dismutase* in the plasma in patients with alcoholic and non-alcoholic liver injuries. Alcohol, v. 2, n. 3, p. 469-472, 1985.

LARANJEIRA, R. *et al.* Alcohol use patterns among Brazilian adults. Brazilian Journal of Psychiatry, v. 32, n. 3, p. 231-241, 2010.

LARUE-ACHAGIOTIS, C.; POUSSARD, A. M.; LOUIS-SYLVESTRE, J. Alcohol drinking, food and fluid intakes and body weight gain in rats. Physiology & behavior, v. 47, n. 3, p. 545-548, 1990.

LARUE-ACHAGIOTIS, C.; POUSSARD, A.-M.; LOUIS-SYLVESTRE, J. Does alcohol promote reactive hypoglycemia in the rat?. Physiology & behavior, v. 47, n. 5, p. 819-823, 1990.

LIGUORI, I. *et al.* Oxidative stress, aging, and diseases. Clinical interventions in aging, v. 13, p. 757, 2018.

LIEBER, C.S. Perspectives: do alcohol calories count?. The American Journal of Clinical Nutrition, v. 54, n. 6, p. 976-982, 1991.

LIEBER, C.S. Role of oxidative stress and antioxidant therapy in alcoholic and nonalcoholic liver diseases. In: Advances in pharmacology. Academic Press, 1996. p. 601-628.

LITTLE, R.E.; GLADEN, B.C. Levels of lipid peroxides in uncomplicated pregnancy: a review of the literature. *Reproductive Toxicology* (Elmsford, NY), v. 13, n. 5, p. 347-352, 1999.

MACIEL *et al.* Compostos fenólicos em diferentes marcas de cerveja: comparação qualitativa de diferentes marcas e sua relação com a saúde humana. *Revista Brasileira Multidisciplinar*, v. 16, n. 1, p. 41-52, 2013.

MACIEIRA, M.S. *et al.* Alcohol dependence induced in rats by semivoluntary intermittent intake. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 30, n. 9, p. 1107-1111, 1997.

MACLURE, M. Demonstration of deductive meta-analysis: ethanol intake and risk of myocardial infarction. *Epidemiologic reviews*, v. 15, n. 2, p. 328-351, 1993.

MAISCH, B. Alcoholic cardiomyopathy. *Herz*, v. 41, n. 6, p. 484-493, 2016.

MAUL, B. *et al.* Central angiotensin II controls alcohol consumption via its AT1 receptor. *The FASEB journal*, v. 19, n. 11, p. 1474-1481, 2005.

MARCHI, K.C. *et al.* NADPH oxidase plays a role on ethanol-induced hypertension and reactive oxygen species generation in the vasculature. *Alcohol and Alcoholism*, v. 51, n. 5, p. 522-534, 2016.

MARQUES, A.C. O uso do álcool e a evolução do conceito de dependência de álcool e outras drogas e tratamento. *Revista Imesc*, v. 3, p. 73-86, 2001.

MARTELLUCCI, S. *et al.* Alcohol binge-drinking damage on the vestibulo-oculomotor reflex. *European archives of oto-rhino-laryngology*, p. 1-8, 2020.

MASALKAR, P. D.; ABHANG, S. A. Oxidative stress and antioxidant status in patients with alcoholic liver disease. *Clinica Chimica Acta*, v. 355, n. 1-2, p. 61-65, 2005.

MENARD, J. Anthology of the renin-angiotensin system: a one hundred reference approach to angiotensin II antagonists. *Journal of hypertension. Supplement: Official Journal of the International Society of Hypertension*, v. 11, n. 3, p. S3-11, 1993.

MEZEY, E. Alcoholic liver disease: roles of alcohol and malnutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 33, n. 12, p. 2709-2718, 1980.

MINCIS, M.; MINCIS, R. Doença hepática alcoólica: diagnóstico e tratamento. *Prática Hospitalar*, v. 48, n. 1, p. 113-118, 2006.

MINCIS, M.; MINCIS, R. Álcool e o fígado. *GED gastroenterol. endosc. dig*, v. 30, n. 4, p. 152-162, 2011.

MINZER, S. *et al.* The Effect of Alcohol on Cardiovascular Risk Factors: Is There New

Information?. *Nutrients*, v. 12, n. 4, p. 912, 2020.

MOREYRA, A.E. *et al.* Acute myocardial infarction in patients with normal coronary arteries after acute ethanol intoxication. *Clinical cardiology*, v. 5, n. 7, p. 425-430, 1982.

MUKAMAL, K.J. *et al.* Genetic instrumental variable analysis: time to call mendelian randomization what it is. The example of alcohol and cardiovascular disease. *European journal of epidemiology*, v. 35, n. 2, p. 93-97, 2020.

NAKAGAWA, P. *et al.* The renin-angiotensin system in the central nervous system and its role in blood pressure regulation. *Current Hypertension Reports*, v. 22, n. 1, p. 1-10, 2020.

NAKASHIMA, M.A. *et al.* Chronic ethanol consumption increases reactive oxygen species generation and the synthesis of pro-inflammatory proteins in the heart through TNFR1-dependent mechanisms. *Cytokine*, v. 121, p. 154734, 2019.

OGDEN, G. R.; WIGHT, A. J. The etiology of oral cancer: alcohol. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 36, n. 4, p. 247-251, 1998.

OJEDA, M. L. *et al.* Oxidative effects of chronic ethanol consumption on the functions of heart and kidney: folic acid supplementation. *Alcohol and alcoholism*, v. 47, n. 4, p. 404-412, 2012.

OLIVEIRA, D.G. *et al.* Consumo de álcool por frequentadores de academia de ginástica. *Jornal Brasileiro de Psiquiatria*, v. 63, n. 2, p. 127-132, 2014.

PAGANO P.J., CLARK J.K., CIFUENTES-PAGANO M.E., Clarck SM, Callis GM, Quinn MT (1997). Localization of a constitutively active, phagocyte-like NADPH oxidase in rabbit aortic adventitia: enhancement by angiotensin II. *Proc Natl Acad Sci* 94:14483-14488.

PAN, H. *et al.* Chronic ethanol consumption inhibits hepatic natural killer cell activity and accelerates murine cytomegalovirus-induced hepatitis. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, v. 30, n. 9, p. 1615-1623, 2006.

PATRICK M.E., Schulenberg JE, Martz ME, Maggs JL, O'Malley PM, Johnston LD. Extreme binge drinking among 12th-grade students in the United States: prevalence and predictors. *JAMA Pediatr.* 2013; 167(11):1019-1025.

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

PAUL, M.; POYAN MEHR, A.; KREUTZ, R. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiological reviews*, v. 86, n. 3, p. 747-803, 2006.

PEACH, M.J. Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action. *Physiological reviews*, v. 57, n. 2, p. 313-370, 1977.

PHILLIPS, M.I.; DE OLIVEIRA, E. M. Brain renin angiotensin in disease. *Journal of molecular medicine*, v. 86, n. 6, p. 715-722, 2008.

PIANO, M.R.; PHILLIPS, S.A. Alcoholic cardiomyopathy: pathophysiologic insights. *Cardiovascular toxicology*, v. 14, n. 4, p. 291-308, 2014.

PIANO M.R. Alcohol's effects on the cardiovascular system. *Alcohol Res.* 38(2):219-241, 2017.

PIANO, M.R. *et al.* Binge drinking episodes in young adults: How should we measure them in a research setting?. *Journal of Studies on Alcohol and Drugs*, v. 78, n. 4, p. 502-511, 2017a.

PIANO, M.R. *et al.* Cardiovascular consequences of binge drinking: an integrative review with implications for advocacy, policy, and research. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, v. 41, n. 3, p. 487-496, 2017b.

PIMENTEL, G.D.; BRESSAN, J.B. O consumo de álcool altera os hormônios reguladores do apetite, aumentando a fome e o peso corporal. *Rev Bras Nutr Clin*, v. 25, n. 1, p. 83-90, 2010.

PINSKY, I. *et al.* Patterns of alcohol use among brazilian adolescents. *Rev Bras Psiquiatr.* 32(3):242-249, 2010.

POLIKANDRIOTIS, J.A. *et al.* Chronic ethanol ingestion increases superoxide production and NADPH oxidase expression in the lung. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, v. 34, n. 3, p. 314-319, 2006.

PRADO, A.K.M. *et al.* Os efeitos do consumo de vinho na saúde humana. *Revista Científica Unilago*, v. 1, n. 1, p. 109-128, 2013.

PREEDY, V. R.; RICHARDSON, P. J. Ethanol induced cardiovascular disease. *British Medical Bulletin*, v. 50, n. 1, p. 152-163, 1994.

RAJA, V. *et al.* Abiotic stress: Interplay between ROS, hormones and MAPKs. *Environmental and Experimental Botany*, v. 137, p. 142-157, 2017.

RAJBANSHI, S.L.A; PANDANABOINA, C.S. Alcohol stress on cardiac tissue—Ameliorative effects of *Thespesia populnea* leaf extract. *Journal of cardiology*, v. 63, n. 6, p. 449-459, 2014.

RAJENDRAM, R.; PREEDY, V. R. Effect of alcohol consumption on the gut. *Digestive Diseases*, v. 23, n. 3-4, p. 214-221, 2005.

RAJZER, M. *et al.* The effect of chronic alcohol consumption on systolic and diastolic left ventricular function. *Przegląd Lekarski*, v. 61, n. 9, p. 895-901, 2004.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; Ritter, J. M.; Flower, R. J.; Henderson G. Rang & Dale.

- Farmacologia. 7ª edição. Rio de Janeiro, Elsevier, 2012.
- RANG, H. P.; DALE, M. M.; Ritter, J. M.; Flower, R. J.; Henderson G. Rang & Dale. Farmacologia. 8ª edição. Rio de Janeiro, Elsevier, 2016.
- RAPOSEIRAS-ROUBÍN, S. *et al.* Impact of renin-angiotensin system blockade on the prognosis of acute coronary syndrome based on left ventricular ejection fraction. *Revista Española de Cardiología (English Edition)*, v. 73, n. 2, p. 114-122, 2020.
- RAVINGEROVÁ, T. *et al.* Ischemic tolerance of rat hearts in acute and chronic phases of experimental diabetes. In: *Biochemistry of Diabetes and Atherosclerosis*. Springer, Boston, MA, 2003. p. 167-174.
- READ J.P., *et al.* Identification of hazardous drinking with the Young Adult Alcohol Consequences Questionnaire: Relative operating characteristics as a function of gender. *Psychol Assess.* 28(10):1276-1289, 2016.
- REN, Z. *et al.* Chronic plus binge ethanol exposure causes more severe pancreatic injury and inflammation. *Toxicology and applied pharmacology*, v. 308, p. 11-19, 2016.
- RIBIÈRE, C. *et al.* Effects of chronic ethanol administration on free radical defence in rat myocardium. *Biochemical pharmacology*, v. 44, n. 8, p. 1495-1500, 1992.
- RICE-EVANS, C.; MILLER, N. J. [241 Total antioxidant status in plasma and body fluids. In: *Methods in enzymology*. Academic Press, 1994. p. 279-293.
- RUBBO, H.; O'DONNELL, V. Nitric oxide, peroxynitrite and lipoxygenase in atherogenesis: mechanistic insights. *Toxicology*, v. 208, n. 2, p. 305-317, 2005.
- SABINO, V. *et al.* Pharmacological characterization of the 20% alcohol intermittent access model in Sardinian alcohol-preferring rats: a model of binge-like drinking. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, v. 37, n. 4, p. 635-643, 2013.
- SALES, E. Aspectos da história do álcool e do alcoolismo no século XIX. *Cadernos de História UFPE*, v. 7, n. 7, 2010.
- SAITOH, D. *et al.* Prevention of ongoing lipid peroxidation by wound excision and superoxide *dismutase* treatment in the burned rat. *The American journal of emergency medicine*, v. 12, n. 2, p. 142-146, 1994.
- SAITOH, D. *et al.* The effect of an SOD derivative (SM-SOD) administration in a burned rat model. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, v. 174, n. 1, p. 31-40, 1994.
- SAITOH, D. *et al.* Characteristics of plasma extracellular SOD in burned patients. *Burns*, v. 27, n. 6, p. 577-581, 2001.
- SANCHEZ, Z. M. A prática de binge drinking entre jovens e o papel das promoções de bebidas alcoólicas: uma questão de saúde pública, *Epidemiol. Serv. Saude*, Brasília,

26(1):195-198, jan-mar 2017.

SANCHIS, C.; ARAGÓN, C.M.G. What we drink when we drink? The role of the acetaldehyde in the alcohol consumption. *Adicciones*, v. 19, n. 1, 2007.

SANTOS, R. A. *et al.* Efeitos cardiovasculares e renais do sistema renina-angiotensina. *Rev. bras. hipertens*, p. 227-236, 2000.

SATTA, R. *et al.* Ovarian hormones contribute to high levels of binge-like drinking by female mice. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, v. 42, n. 2, p. 286-294, 2018.

SCHÄFER, M.; WERNER, S. Oxidative stress in normal and impaired wound repair. *Pharmacological research*, v. 58, n. 2, p. 165-171, 2008.

SCHEFFER *et al.* Dependência de álcool, cocaína e crack e transtornos psiquiátricos. *Psicologia: teoria e pesquisa*, v. 26, n. 3, p. 533-541, 2010.

SCHUCKIT M.A. Alcohol-use disorders. *Lancet* 373:492-501, 2009.

SEITZ, H.K.; SUTER, P.M. Ethanol toxicity and nutritional status. In: *Nutritional Toxicology*. CRC Press, 1994. p. 127-158.

SEITZ, H. K. *et al.* Alcohol and cancer. In: *Recent developments in alcoholism*. Springer, Boston, MA, 1998. p. 67-95.

SECRETARIA NACIONAL ANTIDROGAS (SENAD, 2007). Disponível em: <www.obid.senad.gov.br>.

SHEN, Y. *et al.* Evaluation of the interaction between melatonin and rapamycin for head and neck cancer therapy. 2018.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology: Translation and Integration*, v. 82, n. 2, p. 291-295, 1997.

SIES, H.; BERNDT, C.; JONES, D. P. Oxidative stress. *Annual review of biochemistry*, v. 86, p. 715-748, 2017.

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

SLEEM, M. *et al.* Combination therapy with losartan and L-carnitine protects against endothelial dysfunction of streptozotocin-induced diabetic rats. *European Journal of Pharmacology*, v. 744, p. 10-17, 2014.

SOUZA JR, T.P. de; OLIVEIRA, P.R. de; PEREIRA, B. Exercício físico e estresse oxidativo: efeitos do exercício físico intenso sobre a quimioluminescência urinária e malondialdeído plasmático. *Revista Brasileira de medicina do Esporte*, v. 11, n. 1, p.

91-96, 2005.

STEWART, C.W.; KENNEDY, R.H. Effects of chronic ethanol consumption on aortic constriction in male and female rats. *European journal of pharmacology*, v. 366, n. 1, p. 55-60, 1999.

TRAWCZYŃSKA, I. New Method of Determining Kinetic Parameters for Decomposition of Hydrogen Peroxide by Catalase. *Catalysts*, v. 10, n. 3, p. 323, 2020.

SQUADRITO, G. L.; PRYOR, W. A. The formation of peroxynitrite in vivo from nitric oxide and superoxide. *Chemico-biological interactions*, v. 96, n. 2, p. 203-206, 1995.

SUN, H.; MAYHAN, W.G. Temporal effect of alcohol consumption on reactivity of pial arterioles: role of oxygen radicals. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, v. 280, n. 3, p. H992-H1001, 2001.

SUTER, P.M.; HÄSLER, E.; VETTER, W. Effects of alcohol on energy metabolism and body weight regulation: is alcohol a risk factor for obesity?. *Nutrition Reviews*, v. 55, n. 5, p. 157-171, 1997.

TAJIMA M, K.Y; SUGIYAMA K, O.T., SAKAGAMI H (2009). The redox state of glutathione regulates the hypoxic induction of HIF-1. *Eur J Pharmacol* 606:45-49.

TAKAHASHI, H. *et al.* Effects of dietary fat composition on activities of the microsomal ethanol oxidizing system and ethanol-inducible cytochrome P450 (CYP2E1) in the liver of rats chronically fed ethanol. *Pharmacology & toxicology*, v. 70, n. 5, p. 347-351, 1992.

TAPIA-ROJAS, C. *et al.* Adolescent binge alcohol exposure affects the brain function through mitochondrial impairment. *Molecular Neurobiology*, v. 55, n. 5, p. 4473-4491, 2018.

TIRAPELLI, C.R. *et al.* Ethanol consumption increases blood pressure and alters the responsiveness of the mesenteric vasculature in rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 60, n. 3, p. 331-341, 2008.

TORRETI J. (1982). Sympathetic control of renin release. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 22:167-192.

TOUYZ, R.M.; SCHIFFRIN, E.L. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacological Reviews*, v. 52, n. 4, p. 639-672, 2000.

UND HALBACH, O. B.; ALBRECHT, D. The CNS renin-angiotensin system. *Cell and tissue research*, v. 326, n. 2, p. 599-616, 2006.

US DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES *et al.* National Institute of Alcohol Abuse and Alcoholism. NIAAA council approves definition of binge drinking. *NIAAA Newsletter*; US Department of Health and Human Services:

Washington, DC, USA, 2004.

VADSTRUP, E. S. *et al.* Waist circumference in relation to history of amount and type of alcohol: results from the Copenhagen City Heart Study. *International journal of obesity*, v. 27, n. 2, p. 238-246, 2003.

VALÉRIO, T.B. *et al.* Consumo de bebidas alcoólicas na adiposidade corporal em estudantes universitários. *RBONE-Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento*, v. 10, n. 60, p. 263-270, 2016.

VANDEGRIFT, B.J. *et al.* Estrogen Receptor α Regulates Ethanol Excitation of Ventral Tegmental Area Neurons and Binge Drinking in Female Mice. *Journal of Neuroscience*, 2020.

VARLINSKAYA, E.I. *et al.* Effects of chronic intermittent ethanol exposure during early and late adolescence on anxiety-like behaviors and behavioral flexibility in adulthood. *Behavioural Brain Research*, v. 378, p. 112292, 2020.

VENDEMIALE, G. *et al.* Increased plasma levels of glutathione and malondialdehyde after acute ethanol ingestion in humans. *Journal of Hepatology*, v. 9, n. 3, p. 359-365, 1989.

XU, J. *et al.* Enhanced reactive oxygen species scavenging by overproduction of superoxide *dismutase* and catalase delays postharvest physiological deterioration of cassava storage roots. *Plant physiology*, v. 161, n. 3, p. 1517-1528, 2013.

XU, B.; LI, H. Brain mechanisms of sympathetic activation in heart failure: Roles of the renin-angiotensin system, nitric oxide and pro-inflammatory cytokines. *Molecular medicine reports*, v. 12, n. 6, p. 7823-7829, 2015.

ZALESKI, M. *et al.* Aspectos neurofarmacológicos do uso crônico e da Síndrome de Abstinência do Alcool. *Rev. Bras. Psiquiatr., São Paulo*, v. 26, supl. 1, p. 40-42, May 2004.

ZAFARI AM, U.M, AKERS M, YIN Q, SHAH A, HARRISON DG, TAYLOR WR, GRIEDLING K.K. (1998). Role of NADH/NADPH *oxidase*-derived H₂O₂ in angiotensin II-induced vascular hypertrophy. *Hypertension* 32:488-495.

ZHAO, Q. *et al.* Jacobian maps reveal under-reported brain regions sensitive to extreme binge ethanol intoxication in the rat. *Frontiers in Neuroanatomy*, v. 12, p. 108, 2018.

ZHOU, X. *et al.* Protective effects of hydrogen sulfide against chronic alcohol intake-induced left ventricular remodeling in rats. *Cardiovascular drugs and therapy*, v. 27, n. 3, p. 221-227, 2013.

ZIMA, T. *et al.* Oxidative stress, metabolism of ethanol and alcohol-related diseases. *Journal of biomedical science*, v. 8, n. 1, p. 59-70, 2001.

WARD, R.J. *et al.* Neuroinflammation induced in the hippocampus of 'binge

drinking rats may be mediated by elevated extracellular glutamate content. *Journal of neurochemistry*, v. 111, n. 5, p. 1119-1128, 2009.

WILLIAMS, J. The decomposition of hydrogen peroxide by liver catalase. *The Journal of general physiology*, v. 11, n. 4, p. 309-337, 1928.

WILSNACK, S.C.; WILSNACK, R.W.; KANTOR, L.W. Focus on: women and the costs of alcohol use. *Alcohol research: current reviews*, 2013.

WONG P.C.; TIMMERMANS PB (1996). Historical development of losartan (DuP 753) and angiotensin II receptor subtypes. *Blood Press Suppl.* 3:11-14.

WORRALL, S.; RICHARDSON, P. J.; PREEDY, V. R. Experimental heart muscle damage in alcohol feeding is associated with increased amounts of reduced-and unreduced-acetaldehyde and malondialdehyde-acetaldehyde protein adducts. *Addiction Biology*, v. 5, n. 4, p. 421-427, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION *et al.* Management of Substance Abuse Unit. Global status report on alcohol and health, 2013. World Health Organization, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION *et al.* Management of Substance Abuse Unit. Global status report on alcohol and health, 2017. World Health Organization, 2018.

YAO, P. *et al.* Oxidative damage after chronic ethanol intake in rat tissues: prophylaxis of Ginkgo biloba extract. *Food chemistry*, v. 99, n. 2, p. 305-314, 2006.

YAYALACI, Y.; CELIK, I.; BATI, B. Hepatoprotective and antioxidant activity of linden (*Tilia platyphyllos* L.) infusion against ethanol-induced oxidative stress in rats. *The Journal of Membrane Biology*, v. 247, n. 2, p. 181-188, 2014.

WU, D.; CEDERBAUM, A. I. Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. *Alcohol Research & Health*, v. 27, n. 4, p. 277, 2003.

YAO, E.H. *et al.* Losartan melhora a função prejudicada das células progenitoras endoteliais na hipertensão através de um efeito antioxidante. *Pesquisa sobre Hipertensão*, v. 30, n. 11, p. 1119-1128, 2007.

YOGI, A. *et al.* Acute ethanol intake induces superoxide anion generation and mitogen-activated protein kinase phosphorylation in rat aorta: a role for angiotensin type 1 receptor. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 264, n. 3, p. 470-478, 2012.

YOSHITANI, T. *et al.* Effect of experimental renal failure on the pharmacokinetics of losartan in rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v. 25, n. 8, p. 1077-1083, 2002.

8. ANEXOS



Centro Colaborador da OPAS/OMS para o
Desenvolvimento da Pesquisa em Enfermagem



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENFERMAGEM DE RIBEIRÃO PRETO

Avenida Bandeirantes, 3900 - Ribeirão Preto - São Paulo - Brasil - CEP 14040-902
Fone: 55 16 3315.3382 - 55 16 3315.3381 - Fax: 55 16 3315.0518
www.eerp.usp.br - eerp@usp.br

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - ceua@eerp.usp.br

AUTORIZAÇÃO

Certificamos que a proposta intitulada "*Efeito do consumo de etanol em padrão binge sobre o sistema cardiovascular*", registrada sob nº 19.1.390.22.4, sob a responsabilidade de Carlos Renato Tirapelli e Katiuscia Martins de Araujo, que envolve a manutenção e utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovada *ad referendum* em 23/05/2019 pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto (CEUA-EERP/USP).

Lembramos da obrigatoriedade de apresentação do relatório de atividades, em modelo da CEUA, para emissão do certificado, como disposto nas Resoluções Normativas do CONCEA.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	20/06/2019 a 20/06/2021
Espécie/Linhagem/Raça	Rato heterogênico Wistar Hannover
Nº de animais	72
Peso/Idade	270-300 gramas / 60-70 dias
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central da PUSP-RP

Ribeirão Preto, 23 de maio de 2019.

Gabriela Silva Bisson
Profa. Dra. Gabriela Silva Bisson
 Presidente da CEUA-EERP/USP