

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**Carla Brigagão Pacheco da Silva**

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

**Ribeirão Preto**

**2020**

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

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

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

**Área de concentração:** Toxicologia

**Orientado(a):** Carla Brigagão Pacheco da Silva

**Orientador:** Prof. Dr. Carlos Renato Tirapelli

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

**Ribeirão Preto**

**2020**

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.

Silva, Carla Brigagão Pacheco da

Mecanismos da toxicidade renal induzida pelo consumo crônico de etanol: papel da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS).  
Ribeirão Preto, 2020.

104 p. : il. ; 30 cm.

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

Orientador: Tirapelli, Carlos Renato.

1. Consumo crônico de etanol. 2. Óxido nítrico sintase induzível. 3. Estresse oxidativo. 4. Processo inflamatório. 5. Toxicidade renal.

Nome: SILVA, Carla Brigagão Pacheco da

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

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

Área de Concentração: Toxicologia.

Aprovada em:

Banca examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_  
Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_  
Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_  
Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_  
Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

**“O que sabemos é uma gota, o que ignoramos é um oceano”  
(Isaac Newton)**

## AGRADECIMENTOS

À Deus, que sempre esteve ao meu lado, ouviu minhas orações e me deu forças para continuar mesmo nos dias mais difíceis. Obrigada por nunca desistir de mim!

À minha família pelas orações, carinho e apoio mesmo a 300 quilômetros de distância. Obrigada por sempre acreditarem em mim e me incentivarem a correr atrás dos meus sonhos. Agradeço também à Mel e ao Snoopy, que sempre foram minhas fontes para recarregar minhas energias... obrigada meus pequenos de quatro patas por serem luz e trazerem mais amor pra minha vida!

Ao professor Carlos Renato Tirapelli pela orientação e apoio durante essa jornada de 4 anos. Obrigada por ser um orientador presente e estar sempre disponível para a discussão de resultados, planejamento de novas etapas e ideias para sempre melhorar nosso projeto. Obrigada por acreditar no meu potencial e compartilhar comigo um pouco de todo o seu conhecimento.

Ao meu namorado Caio pelo companheirismo, amor, incentivo e, principalmente, apoio emocional na reta final do doutorado.

Aos amigos que o Laboratório de Farmacologia Cardiovascular me presenteou. Algumas carinhas novas e outras nem tanto, mas que durante o doutorado se fizeram presentes. Janaína e Letícia, agradeço por me receberem tão bem no laboratório e na vida de vocês; obrigada por nosso triângulo sem base e pela amizade que criamos. Aos amigos Gabriel e Wanessa, meus arianos queridos, por me permitirem sentir na USP-RP, o ambiente agradável de amizade, companheirismo e incentivo mútuo que existia na UNIFAL-MG. À Natália pela amizade, conversas e ensinamentos. Aos mestrandos Júnior e Katiúscia pelos momentos de descontração no laboratório. Aos alunos de iniciação científica, Marcelo, Paola, Drieli, Sthefany, Arthur, José e Victor... obrigada por me darem a oportunidade de aprender e ensinar com vocês. Além disso, muitos de vocês foram mais que colegas, se tornaram amigos. E tenho a certeza que Deus colocou cada um na minha vida por um motivo e agradeço pela oportunidade de ter convivido com vocês. Podem sempre contar comigo!

Às amigas Marília e Lara, que se fizeram presentes em todas as etapas do meu doutorado. Obrigada por sempre me ajudarem nas prestações de contas, dúvidas sobre toxicologia, incentivo acadêmico, apoio emocional e por compartilharem comigo suas alegrias e angústias. Amigas que a UNIFAL me apresentou e que a USP uniu.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP) – USP pela oportunidade de realização do curso de doutorado.

Aos professores das minhas bancas examinadoras, obrigada pela disponibilidade, contribuição e atenção concedidas.

Aos funcionários do Biotério Central do *Campus* da USP de Ribeirão Preto e do Centro de Criação de Camundongos Especiais (CCCE) da FMRP, pela criação e cuidado com os camundongos, os quais foram imprescindíveis para o desenvolvimento do meu projeto de doutorado.

À professora Cláudia Maria Padovan pela disponibilização do seu laboratório para a realização da perfusão dos meus animais.

À professora e patologista Leandra Náira Zambelli Ramalho pela colaboração e análise dos experimentos de histologia e imuno-histoquímica.

A todos os funcionários do Programa de Pós-Graduação em Toxicologia, da FCFRP-USP, pelo apoio e serviços prestados.

Agradeço também o apoio dos técnicos Tadeu (FMRP) e Marcelo Eduardo Batalhão (EERP) pela disposição e profissionalismo.

Ao apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – 2016/17623-9), o qual foi imprescindível para a realização deste trabalho de doutorado.

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

**Muito obrigada!**

## RESUMO

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

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

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



## ABSTRACT

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

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

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

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Ativação de metaloproteinases de matriz (MMPs).....	9
<b>Figura 2</b>	Modelo utilizado para o tratamento com etanol.....	15
<b>Figura 3</b>	Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a expressão de iNOS em córtex renal de camundongos WT.....	32
<b>Figura 4</b>	Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a ingestão de líquido, o consumo de ração e o peso corporal dos camundongos.....	34
<b>Figura 5</b>	Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a pressão arterial sistólica.....	35
<b>Figura 6</b>	Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a função renal de camundongos WT e iNOS <sup>-/-</sup> .....	36
<b>Figura 7</b>	Efeito do consumo crônico de etanol sobre as mudanças morfológicas de córtex renal de camundongos WT e iNOS <sup>-/-</sup> .....	37
<b>Figura 8</b>	Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a formação de O <sub>2</sub> <sup>-</sup> e H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> em córtex renal de camundongos WT e iNOS <sup>-/-</sup> .....	38
<b>Figura 9</b>	Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a geração de ERO <i>in situ</i> em córtex renal de camundongos WT e iNOS <sup>-/-</sup> .....	39
<b>Figura 10</b>	Efeito do tratamento crônico com etanol sobre os níveis de nitrato/nitrito (NO <sub>x</sub> ) em córtex renal de camundongos WT e iNOS <sup>-/-</sup> .....	41
<b>Figura 11</b>	Efeito do tratamento crônico com etanol sobre os níveis teciduais de TBARS em córtex renal de camundongos WT e iNOS <sup>-/-</sup> .....	42
<b>Figura 12</b>	Efeito do tratamento crônico com etanol sobre os sistemas antioxidantes enzimático e não enzimático em córtex renal de camundongos WT e iNOS <sup>-/-</sup> .....	43
<b>Figura 13</b>	Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a expressão proteica da Nox1, Nox2 e Nox4 em córtex renal de camundongos WT e iNOS <sup>-/-</sup> .....	44
<b>Figura 14</b>	Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a expressão proteica das enzimas antioxidantes SOD1, SOD2, SOD3 e catalase em córtex renal de camundongos WT e iNOS <sup>-/-</sup> .....	45
<b>Figura 15</b>	Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a expressão proteica das enzimas eNOS e nNOS em córtex renal de camundongos WT e iNOS <sup>-/-</sup> .....	46
<b>Figura 16</b>	Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a expressão proteica de MMP2, MMP9, TIMP1 e TIMP2 em córtex renal de camundongos WT e iNOS <sup>-/-</sup> .....	47
<b>Figura 17</b>	Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a expressão proteica dos fatores de transcrição Nrf2 e NF-κB em córtex renal de camundongos WT e iNOS <sup>-/-</sup> .....	48
<b>Figura 18</b>	Efeito do tratamento crônico com etanol sobre os níveis de TNF-α, IL-1β, IL-6 e IL-10 em córtex renal de camundongos WT e iNOS <sup>-/-</sup> .....	49
<b>Figura 19</b>	Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a atividade da MPO em córtex renal de camundongos WT e iNOS <sup>-/-</sup> .....	50

<b>Figura 20</b>	Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a atividade gelatinolítica da MMP-2 em córtex renal de camundongos WT e iNOS <sup>-/-</sup> .....	51
<b>Figura 21</b>	Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a atividade gelatinolítica da MMP-9 em córtex renal de camundongos WT e iNOS <sup>-/-</sup> .....	52
<b>Figura 22</b>	Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a atividade gelatinolítica <i>in situ</i> de metaloproteinases de matriz (MMPs) em córtex renal de camundongos WT e iNOS <sup>-/-</sup> .....	53

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Anticorpos primários e secundários, com suas respectivas diluições, utilizados para realização de <i>Western Blotting</i> .....	26
-----------------	---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

±	Mais ou menos
%	Porcentagem
®	Marca registrada
™	Trademark
°C	Grau célsius
λ	Comprimento de onda
μg	Micrograma
μL	Micro litro
μm	Micrômetro
μM	Micromolar
μmol	Micromol
Ang II	Angiotensina II
BH <sub>4</sub>	Tetraidrobiopterina
CaCl <sub>2</sub>	Cloreto de cálcio
Casp-1	Caspase-1
CCCE	Centro de Criação de Camundongos Especiais
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
cm <sup>2</sup>	Centímetros quadrados
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CYP2E1	Citocromo P450-2E1
DAB	3,3'-diaminobenzidina
DAF-2	3,4-diaminofluoresceína
DAF-2DA	Diacetato de 4,5-diaminofluoresceína
DAF-2T	Triazolodiaminofluoresceína
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindole
DCFH-DA	Diacetato de 2,7-diclorofluoresceína
DHE	Dihidroetídeo
dL	Decilitro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
D.O.	Densidade óptica
DTNB	Ácido 5,5-ditiobis (2-nitrobenzóico)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
EGTA	Ácido etilenoglicol tetracético
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EPM	Erro padrão da média
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FAD	Flavina adenina dinucleótido
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FMN	Flavina mononucleótido
g	Gramas
GPx	Glutaciona peroxidase
GSH	Glutaciona reduzida
GSSG	Glutaciona oxidada
h	hora(s)
H <sup>+</sup>	Íon hidrogênio

<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrogênio
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	Ácido sulfúrico
<b>HCl</b>	Ácido clorídrico
<b>HPF</b>	<i>High power fields</i> : campos de grande aumento
<b>HRP</b>	Peroxidase <i>horseradish</i>
<b>HTAB</b>	Brometo de hexa-1,6-bis-deciltrimetilamônio
<b>ICAM-1</b>	Molécula de adesão intercelular-1
<b>IκBα</b>	Inibidor de proteína NF-κB alfa
<b>IFN-γ</b>	Interferon gama
<b>IGF-I</b>	Fator de crescimento semelhante à insulina
<b>IL</b>	Interleucina
<b>iNOS</b>	Óxido nítrico sintase induzível
<b>iNOS<sup>-/-</sup></b>	Nocautes para a enzima óxido nítrico sintase
<b>K<sup>+</sup></b>	Potássio
<b>Kcal</b>	Quilocaloria
<b>KCl</b>	Cloreto de potássio
<b>kDa</b>	Quilodaltons
<b>Kg</b>	Quilograma
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	Fosfato dibásico de potássio
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Fosfato monobásico de potássio
<b>L</b>	Litro
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeo
<b>m</b>	Metro
<b>M</b>	Molar
<b>MCP-1</b>	Proteína quimiotática de monócitos 1
<b>MDA</b>	Malondialdeído
<b>MEC</b>	Matriz extracelular
<b>mL</b>	Mililitros
<b>mg</b>	Miligrama
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	Sulfato de magnésio
<b>min</b>	Minuto
<b>mm</b>	Milímetro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>mmol</b>	Milimol
<b>MMP</b>	Metaloproteinase de matriz
<b>mmHg</b>	Milímetros de mercúrio
<b>MPO</b>	Mieloperoxidase
<b>mRNA</b>	Ácido ribonucléico mensageiro
<b>Na<sup>+</sup></b>	Sódio
<b>NaCl</b>	Cloreto de sódio
<b>NADH</b>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
<b>NADP<sup>+</sup></b>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
<b>NADPH</b>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
<b>NAD(P)H oxidase</b>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	Bicarbonato de sódio
<b>NaPO<sub>4</sub></b>	Fosfato de sódio
<b>NF-κB</b>	Fator nuclear kappa B
<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	Sulfato de amônio
<b>NIK</b>	Quinase indutora de NF-κB

<b>nm</b>	Nanômetro
<b>nmol</b>	Nanomol
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>NO<sub>2</sub></b>	Nitrito
<b>NO<sub>3</sub></b>	Nitrato
<b>NO<sub>2</sub><sup>·</sup></b>	Radical dióxido de nitrogênio
<b>NOS</b>	Óxido nítrico sintase
<b>nNOS</b>	Óxido nítrico sintase neuronal
<b>Nox</b>	<i>Nonphagocytic NADPH oxidase</i>
<b>NO<sub>x</sub></b>	Nitrato/nitrito
<b>Nrf2</b>	Fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2
<b>O<sub>2</sub></b>	Oxigênio molecular
<b>O<sub>2</sub><sup>·-</sup></b>	Ânion superóxido
<b>OCT</b>	Resina para congelamento rápido de tecidos e secção em criostato
<b>OH<sup>·</sup></b>	Radical hidroxila
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>ONOO<sup>-</sup></b>	Peroxinitrito
<b>ONOOH</b>	Ácido peroxinitroso
<b>PAS</b>	Pressão arterial sistólica
<b>PBS</b>	Tampão fosfato em salina
<b>PFA</b>	Paraformaldeído
<b>pg</b>	Picogramas
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato de sódio
<b>SFB</b>	Soro fetal bovino
<b>SENAD</b>	Secretaria Nacional de Políticas sobre Drogas
<b>SNS</b>	Sistema nervoso simpático
<b>SOD</b>	Superóxido dismutase
<b>SRA</b>	Sistema renina angiotensina
<b>TBARS</b>	Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
<b>TCA</b>	Ácido tricloroacético
<b>TGF-β</b>	Fator de crescimento tumoral beta
<b>TIMP</b>	Inibidores teciduais de metaloproteinases de matriz
<b>TLR</b>	Receptor do tipo Toll
<b>TMB</b>	3,3', 3,3'-tetrametilbenzidina
<b>TNB</b>	5-tio-2-ácido nitrobenzóico
<b>TNFR1<sup>-/-</sup></b>	Nocautes para o receptor R1 do TNF-α
<b>TNF-α</b>	Fator de necrose tumoral alfa
<b>URL</b>	Unidades relativas de luz
<b>V</b>	Volts
<b>Vigitel</b>	Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico
<b>vol./vol.</b>	Volume/volume
<b>WT</b>	<i>Wild type</i> : camundongos selvagens (não modificados geneticamente)
<b>Zn<sup>+2</sup></b>	Zinco

## SUMÁRIO

<b>Resumo</b> .....	i
<b>Abstract</b> .....	ii
<b>Lista de figuras</b> .....	iii
<b>Lista de tabelas</b> .....	v
<b>Lista de abreviaturas, siglas e símbolos</b> .....	vi
1 INTRODUÇÃO .....	1
1.1 Etanol.....	1
1.2 NAD(P)H oxidase .....	3
1.3 Biomarcadores de danos oxidativos.....	4
1.4 Processo inflamatório.....	8
1.5 Metaloproteinases de matriz.....	9
2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVO.....	13
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
3.1 Animais.....	14
3.2 Grupos experimentais.....	14
3.3 Método de eutanásia.....	15
3.4 Determinação da concentração de proteína total .....	15
3.5 Dosagem dos níveis sanguíneos de etanol.....	16
3.6 Evolução temporal do consumo de ração, da ingestão de líquidos e do ganho de peso corporal dos animais .....	16
3.7 Avaliação da pressão arterial sistólica .....	17
3.8 Avaliação da função renal .....	17
3.9 Avaliação do estresse oxidativo.....	18
3.9.1 Determinação da concentração do $O_2^{\cdot-}$ pelo método de quimioluminescência da lucigenina em córtex renal de camundongos.....	18
3.9.2 Quantificação da geração de ERO <i>in situ</i> em córtex renal de camundongos .....	18
3.9.3 Avaliação dos níveis de $H_2O_2$ por Amplex Red em córtex renal de camundongos.....	19
3.9.4 Quantificação da geração de $H_2O_2$ <i>in situ</i> em córtex renal de camundongos .....	19
3.9.5 Determinação dos níveis de nitrato/nitrito ( $NO_x$ ) em córtex renal de camundongos .....	20
3.9.6 Quantificação da geração de NO <i>in situ</i> em córtex renal de camundongos.....	20
3.9.7 Determinação de TBARS em córtex renal de camundongos .....	21
3.10 Avaliação da capacidade antioxidante .....	21
3.10.1 Determinação da atividade enzimática da SOD em córtex renal de camundongos .....	21
3.10.2 Determinação da atividade enzimática da catalase em córtex renal de camundongos ..	22
3.10.3 Determinação da atividade enzimática da glutathiona peroxidase (GPx) em córtex renal de camundongos .....	22



3.10.4 Determinação dos níveis de GSH em córtex renal de camundongos.....	23
3.10.5 Determinação dos níveis de GSSG em córtex renal de camundongos.....	23
3.11 Determinação da expressão de Nox (1,2,4), SOD (1,2,3), catalase, MMP (2,9), TIMP (1,2), eNOS, nNOS, fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2), NF-κB pelo método de <i>Western Blotting</i> em córtex renal de camundongos.....	23
3.11.1 Isolamento das frações nuclear e citosólica do NF-κB .....	24
3.11.2 <i>Western Blotting</i> .....	24
3.12 Avaliação dos níveis de TNF-α, IL-1β, IL-6 e IL-10 em córtex renal de camundongos.	26
3.13 Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO) em córtex renal de camundongos .....	27
3.14 Avaliação da atividade de MMP.....	27
3.14.1 Determinação da atividade de MMP por zimografia em gel em córtex renal de camundongos.....	28
3.14.1.1 Preparo das amostras .....	28
3.14.1.2 Dosagem de proteína pelo método de Bradford.....	28
3.14.1.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% .....	28
3.14.2 Determinação da atividade gelatinolítica de MMP <i>in situ</i> em córtex renal de camundongos.....	29
3.15 Estudo morfológico em córtex renal de camundongos .....	29
3.15.1 Histologia.....	30
3.15.2 Imuno-histoquímica.....	30
3.16 Análise estatística.....	31
4 RESULTADOS .....	32
4.1 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a expressão de iNOS em córtex renal de camundongos WT .....	32
4.2 Medida dos níveis sanguíneos de etanol .....	33
4.3 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a evolução temporal do consumo líquido, de ração e do peso dos animais .....	33
4.4 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a pressão arterial sistólica.....	35
4.5 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a função renal .....	35
4.6 Estudo das alterações histopatológicas em córtex renal de camundongos.....	36
4.7 Determinação dos níveis teciduais de EROs em córtex renal .....	37
4.8 Determinação dos níveis teciduais de ERNs em córtex renal .....	40
4.9 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre os níveis de lipoperoxidação em córtex renal .....	42
4.10 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre os sistemas antioxidantes enzimático e não enzimático em córtex renal de camundongos.....	42
4.11 Avaliação da expressão proteica em córtex renal .....	43

4.11.1 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a expressão proteica da Nox1, Nox2 e Nox4.....	43
4.11.2 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a expressão proteica das enzimas antioxidantes SOD1, SOD2, SOD3 e catalase .....	44
4.11.3 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a expressão proteica de eNOS e nNOS .....	45
4.11.4 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a expressão proteica de MMPs e TIMPs .....	46
4.11.5 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a expressão proteica dos fatores de transcrição Nrf2 e NF-κB.....	47
4.12 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre os níveis de TNF-α, IL-1β, IL-6 e IL-10 em córtex renal .....	48
4.13 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a atividade da MPO em córtex renal .....	49
4.14 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a atividade gelatinolítica <i>in situ</i> de MMPs .....	50
5 DISCUSSÃO .....	54
6 CONCLUSÕES .....	69
REFERÊNCIAS .....	70
ANEXO I – Aprovação da CEUA.....	87

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Etanol

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

O consumo de álcool é medido por doses<sup>1</sup>, sendo os principais padrões de consumo de bebidas alcoólicas identificados como uso moderado (7-10 doses/semana para mulheres e 14-15 doses/semana para homens), uso excessivo (8 ou mais doses/semana para mulheres e 15 ou mais doses/semana para homens) e uso pesado episódico – conhecido como *binge drinking* – (4 ou mais doses para mulheres e 5 ou mais doses para homens, em uma única ocasião) (SENAD, 2011; OMS, 2014; US DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES; US DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 2015).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## **1.2 NAD(P)H oxidase**

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

encontrada em neutrófilos, é formada por 5 subunidades: p47phox (“*phox*” ou “*phagocyte oxidase*” – oxidase fagocítica), p67phox, p40phox, p22phox e a subunidade catalítica gp91phox (também chamada de Nox2). As subunidades p47phox, p67phox e p40phox estão localizadas no citoplasma enquanto as subunidades gp91phox e p22phox estão localizadas na membrana, onde são encontradas na forma de uma flavoproteína heterodimérica, o citocromo *b558*. Em situações de estimulação celular, ocorre a fosforilação do aminoácido serina da subunidade p47phox e as unidades citoplasmáticas formam um complexo, que se transloca até a membrana, onde se associa ao citocromo *b558* para formar a enzima ativa, que tem por função transferir elétrons do substrato (NADPH ou NADH) para o O<sub>2</sub>, formando assim o O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (HAORAH et al., 2008; PARAVICINI; TOUYZ, 2008; SEDEEK et al., 2013).



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

No rim, o principal homólogo é a Nox4 que não participa apenas das funções renais normais, mas também contribui para o desenvolvimento de doenças, como hiperglicemia, nefropatia diabética, disfunção glomerular associada à diabetes, fibrose e outras doenças renais crônicas (JHA et al., 2014; OKAMURA; PENNATHUR, 2015). A Nox4 é a principal fonte de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) entre as subunidades pertencentes à família Nox das NAD(P)H oxidases, principalmente quando comparada aos homólogos Nox1 e Nox2, uma vez que possui uma alça extracitosólica (*E-loop*) que obstrui a liberação do O<sub>2</sub><sup>•-</sup> formado e fornece uma fonte de prótons, permitindo uma rápida dismutação de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (TAKAC et al., 2011; GORIN, 2013; OKAMURA; PENNATHUR, 2015).

### 1.3 Biomarcadores de danos oxidativos

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

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

O NO é sintetizado a partir da oxidação enzimática do aminoácido L-arginina, cujos produtos finais são a L-citrulina e o NO, e requer O<sub>2</sub>, NADPH, tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>), flavina adenina dinucleótido (FAD), flavina mononucleótido (FMN) e calmodulina como co-fatores. A reação é catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) que possui três isoformas principais: a neuronal (nNOS ou NOS1), a endotelial (eNOS ou NOS3) e a induzível (iNOS ou NOS2) (FLORA FILHO; ZILBERSTEIN, 2000; DAVIS et al., 2001; DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003; SHARMA, 2004; VOISIN et al., 2014).

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

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

porção espessa ascendente da alça de Henle, no endotélio glomerular, no túbulo proximal e nos ductos coletores e auxilia na regulação do volume de líquido extracelular. O NO produzido participa da regulação da secreção de renina, regula a microcirculação na medula renal e protege contra o estresse oxidativo. No ramo ascendente grosso, o NO diminui a reabsorção de cloreto de sódio (NaCl) e bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>) (GOLIGORSKY; BRODSKY; NOIRI, 2002; ORTIZ; GARVIN, 2003; SHARMA, 2004). A enzima nNOS é expressa nos ductos coletores, na mácula densa e em nervos renais pélvicos, e tem por função a modulação do mecanismo de retroalimentação túbulo-glomerular (SHARMA, 2004).

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

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



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

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



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

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

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

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

#### **1.4 Processo inflamatório**

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

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

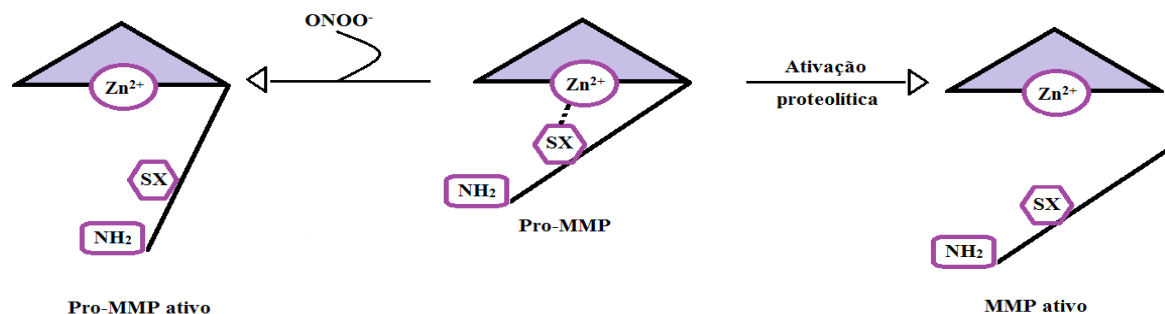
Entretanto, um aumento na indução de mediadores da inflamação, como TNF- $\alpha$ , IL-6 e NF- $\kappa$ B, foi observado após exposição crônica ao etanol tanto em modelos *in vitro* (SZABO et al., 2007) quanto *in vivo* (LEITE et al., 2017; SIMPLICIO et al., 2017; CERON et al., 2018). Além disso, estudos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

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

### 1.5 Metaloproteinases de matriz

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## **2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVO**

Apesar de alguns estudos descreverem que o consumo crônico de etanol acarreta alterações da função renal, os mecanismos envolvidos nessa resposta não foram totalmente elucidados. Uma vez que o consumo crônico de etanol figura como um fator de risco no desenvolvimento de nefropatia, torna-se pertinente o estudo dos mecanismos envolvidos nas alterações funcionais e celulares decorrentes deste consumo. O objetivo do presente estudo foi avaliar a participação da iNOS na toxicidade renal induzida pelo consumo crônico de etanol.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos isogênicos da linhagem C57BL/6J (*wild type* – WT) e nocautes para a enzima iNOS (iNOS<sup>-/-</sup>), com idade média entre 50 e 80 dias (20 a 25 gramas), provenientes do Biotério Central do *Campus* da USP de Ribeirão Preto e do Centro de Criação de Camundongos Especiais (CCCE) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo. Os camundongos iNOS<sup>-/-</sup> foram originalmente adquiridos pelo CCCE da Jackson Laboratories (B6.129P2-Nos2<sup>tm1Lau</sup>/J, stock#002609, Bar Harbor, ME, EUA). Os animais foram distribuídos aleatoriamente para a montagem dos grupos de estudo e separados em grupos de até seis animais em mini-isoladores (1.612 cm<sup>2</sup> de piso) para rack ventilada modelo AL21 (Alesco, São Paulo, SP, Brasil). A cama de maravalha foi trocada três vezes por semana. Os animais foram alocados no Biotério de Manutenção da EERP-USP que possui temperatura controlada (22 ± 1°C) e ciclo automático de claro/escuro de 12 h (luzes acesas entre às 06h00min e 18h00min). Os protocolos experimentais estão em acordo com as leis estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto (Protocolo número: 14.1.847.53.0) (ANEXO I).

#### 3.2 Grupos experimentais

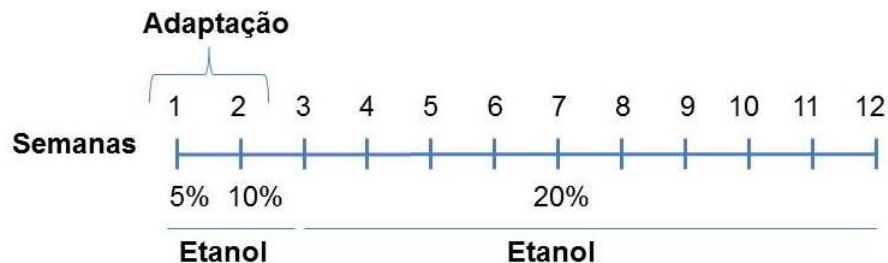
Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos:

- I) Grupo controle WT: receberam água filtrada e ração comercial para roedores “*ad libitum*”.
- II) Grupo controle iNOS<sup>-/-</sup>: receberam água filtrada e ração comercial para roedores “*ad libitum*”.
- III) Grupo etanol WT: receberam diariamente solução de etanol em água e ração comercial para roedores “*ad libitum*”.
- IV) Grupo etanol iNOS<sup>-/-</sup>: receberam diariamente solução de etanol em água e ração comercial para roedores “*ad libitum*”.

Os animais dos grupos etanol foram condicionados a um período de adaptação de duas semanas, que consistiu no fornecimento de etanol em concentrações crescentes semanais de 5 e 10% (vol./vol.), tendo início a fase experimental com 20% (vol./vol.) de etanol (Synth,



Diadema, SP, Brasil) a partir da terceira semana de tratamento (Figura 2). Esse modelo experimental de tratamento crônico de etanol por 12 semanas foi previamente validado por nosso grupo de pesquisa (SIMPLICIO et al., 2017; CERON et al., 2018; NAKASHIMA et al., 2019), onde evidenciamos aumento do estresse oxidativo e/ou da expressão da iNOS.



**Figura 2. Modelo utilizado para o tratamento com etanol.** Os animais foram condicionados a um breve período de adaptação gradativa do consumo de etanol. Essa adaptação consistiu no fornecimento de etanol em concentrações de 5 e 10% (vol./vol.), seguido pelo tratamento, no qual os animais receberam solução de etanol 20% (vol./vol.) por 10 semanas (SIMPLICIO et al., 2017; CERON et al., 2018; NAKASHIMA et al., 2019).

### 3.3 Método de eutanásia

Após as 12 semanas, 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 da artéria abdominal seguida por rompimento do diafragma.

Foram realizados três procedimentos diferentes para a coleta das amostras de córtex renal dos animais: 1) as amostras de córtex renal foram coletadas em Tissue-Tek® - OCT™ (resina para congelamento rápido de tecidos e secção em criostato, Sakura Finetek, Torrance, CA, EUA) para a determinação dos níveis de ERO e espécies reativas de nitrogênio (ERN), e a avaliação da atividade gelatinolítica de MMP *in situ*; 2) os animais foram perfundidos com solução de paraformaldeído (PFA) 4%, sendo os rins coletados para as análises histopatológica e de imuno-histoquímica para iNOS; 3) as amostras de córtex renal foram coletadas, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80°C para os demais ensaios bioquímicos. As amostras de sangue foram coletadas pelo plexo retro-orbital e armazenadas a -80°C até o dia da realização dos ensaios bioquímicos.

### 3.4 Determinação da concentração de proteína total

A determinação do conteúdo proteico de cada amostra foi realizada para a normalização dos resultados de todos os ensaios bioquímicos descritos a seguir, exceto para o ensaio da atividade gelatinolítica de MMPs por zimografia em gel. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Lowry (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA). A leitura das amostras foi realizada em leitor de microplacas em comprimento de onda de 750 nm.

### **3.5 Dosagem dos níveis sanguíneos de etanol**

As amostras de sangue foram acondicionadas em tubos contendo o conservador fluoreto de sódio (1 mg/mL de sangue). Posteriormente, 100 µL de amostra foram transferidas para tubos *headspace* de 20 mL, contendo 500 µL de solução aquosa de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 10%. O isobutanol (100 mg/dL) foi utilizado como padrão interno. Os frascos foram devidamente lacrados e colocados em suporte do amostrador automático, operando no modo *headspace* e incubados sob agitação a 11,6 x g por 15 min a 80°C. A análise da concentração de etanol das amostras procedeu-se no cromatógrafo em fase gasosa Varian CP3380 (Varian, CA, EUA) equipado com detector de ionização por chama e coluna capilar de sílica fundida Carbowax (30 m × 0,25 mm I.D., espessura 0,25 µm) (Chrompack, São Paulo, SP, Brasil). O modo de injeção foi realizado sem divisão de amostra por 30 segundos. A temperatura da coluna foi ajustada de 40°C (4 min) a 220°C (2 min) (15°C/min). A temperatura do injetor e detector foram ajustadas para 220 e 300°C, respectivamente. Os resultados foram expressos em mg de etanol/dL de sangue (GONZAGA et al., 2015).

***Objetivo:** Determinar os níveis sanguíneos de etanol de camundongos após tratamento crônico por 12 semanas.*

### **3.6 Evolução temporal do consumo de ração, da ingestão de líquidos e do ganho de peso corporal dos animais**

Foram realizadas medidas semanais do consumo de ração, da ingestão de líquidos e do peso dos animais dos quatro grupos experimentais, durante três tratamentos diferentes. Os resultados foram expressos em gramas do consumo médio de ração, em mililitros do consumo médio de líquidos (água ou solução de etanol) e em gramas do peso médio dos animais de cada grupo.

*Objetivo:* Avaliar se o consumo crônico de etanol influencia no consumo sólido e líquido, e no ganho de peso corporal dos camundongos.

### **3.7 Avaliação da pressão arterial sistólica**

A pressão arterial sistólica (PAS) foi avaliada semanalmente pelo método não invasivo da pletismografia de cauda, utilizando o pletismógrafo EFF306 (Insight, Ribeirão Preto, SP, Brasil). Os animais passaram por um período de adaptação, onde foram realizadas 3 aferições da pressão arterial no período de três dias. Para a análise, um manguito acoplado a um transdutor de pressão foi colocado em torno da cauda dos animais acordados, previamente aquecidos em câmaras com temperatura a 37°C por 20 min. Os resultados foram obtidos por uma média de três avaliações consecutivas para cada animal e a PAS foi expressa em mmHg (PASSAGLIA et al., 2015).

*Objetivo:* Avaliar se o consumo crônico de etanol induz aumento da pressão arterial em camundongos.

### **3.8 Avaliação da função renal**

As amostras de sangue foram coletadas em seringas sem anticoagulante e, imediatamente, centrifugadas a  $6.500 \times g$  por 15 min a 4°C. O soro foi utilizado para as determinações dos níveis de ureia, creatinina e dos íons sódio ( $\text{Na}^+$ ) e potássio ( $\text{K}^+$ ), seguindo as instruções dos fabricantes. As concentrações obtidas foram utilizadas como indicadores da função renal.

A determinação dos níveis séricos de ureia e creatinina foi realizada seguindo as instruções do fabricante dos kits Ureia CE (#27-500, Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil) e Creatinina (#35-100, Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil), nos comprimentos de onda de 595 nm e 490 nm, respectivamente. Os resultados foram expressos em mg/dL.

A determinação dos níveis séricos dos íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  foi realizada seguindo as instruções do fabricante dos kits Sódio enzimático (#124-1, Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil) e Potássio enzimático (#125-1, Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil), no comprimento de onda de 405 nm. Os resultados foram expressos em mmol/L.

*Objetivo:* Verificar se o consumo crônico de etanol induz alteração na função renal e a participação da iNOS nessa resposta.

### 3.9 Avaliação do estresse oxidativo

*Objetivo:* Avaliar se o consumo crônico de etanol induz formação de ERO, ERN e lipoperoxidação, e a participação da iNOS nessa resposta.

#### 3.9.1 Determinação da concentração do $O_2^{\cdot-}$ pelo método de quimioluminescência da lucigenina em córtex renal de camundongos

Amostras de córtex renal foram coletadas, congeladas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em tampão fosfato ( $KH_2PO_4$  50 mmol/L, EGTA 1 mmol/L e sacarose 150 mmol/L, pH 7,4). A reação foi iniciada pela adição de NADPH (0,1 mmol/L) à suspensão, chegando ao volume final de 250  $\mu$ L, contendo 50  $\mu$ L de amostra, lucigenina (5  $\mu$ mol/L) e tampão fosfato. Os valores foram obtidos a partir da subtração do valor basal (obtido pela medida da amostra, tampão fosfato juntamente com lucigenina) pelo valor obtido após adição de NADPH. Foram realizados 30 ciclos de leitura em luminômetro Orion II – Microplate Luminometer MPL4 (Berthold Detection Systems, Pforzheim, Alemanha). Os resultados foram normalizados pela concentração proteica de cada amostra e expressos como URL (unidades relativas de luz)/mg de proteína (YOGI et al., 2010).

#### 3.9.2 Quantificação da geração de ERO *in situ* em córtex renal de camundongos

Para a visualização *in situ* da geração de ERO, as amostras de córtex renal foram coletadas, embebidas em Tissue-Tek® - OCT™ (Sakura Finetek, Torrance, CA, EUA) e congeladas em nitrogênio líquido. Os tecidos foram cortados em criostato (5  $\mu$ m de espessura) e para a avaliação da produção de ERO foram incubados com a sonda fluorescente de dihidroetídeo (DHE, 1  $\mu$ mol/L). O DHE é rapidamente oxidado, no meio intracelular, a etídeo e 2-hidroxi-etídeo, produtos que emitem fluorescência vermelha (TONINI et al., 2013). A oxidação do DHE pelo  $O_2^{\cdot-}$  resulta na formação do oxietídeo, enquanto que outras ERO podem oxidá-lo a etídeo, porém esses produtos de oxidação podem ser distinguidos pelos seus comprimentos de onda específicos (ZHAO et al., 2003; FERNANDES et al., 2007). A sonda foi diluída em tampão fosfato em salina (PBS) (pH 7,4) e os tecidos foram incubados por 30 min em uma câmara úmida, escura e aquecida a 37°C. Os cortes foram lavados três vezes com PBS (pH 7,4) (MARCHI et al., 2016; DINIZ et al., 2017). Utilizando um microscópio de

fluorescência acoplado à câmera fotográfica (Carl Zeiss Microscopy Ltd., Alemanha), as secções de córtex renal foram visualizadas utilizando os comprimentos de onda de 550 nm ( $\lambda$ excitação) e 570 nm ( $\lambda$ emissão). As imagens foram fotografadas em aumento de 400x e representam a produção qualitativa das ERO no córtex renal. Foi utilizado o *software ImageJ* (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA) para avaliar a intensidade de fluorescência, a qual foi quantificada pela média aritmética obtida em 10 campos por imagem. Os resultados foram expressos como intensidade de fluorescência (unidades arbitrárias).

### 3.9.3 Avaliação dos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por Amplex Red em córtex renal de camundongos

A concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi avaliada em córtex renal utilizando o kit Amplex Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay (#A22188, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). O córtex renal foi coletado e homogeneizado em solução de Krebs gelado (NaCl 130 mmol/L; KCl 4,7 mmol/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 mmol/L; MgSO<sub>4</sub> 1,2 mmol/L; NaHCO<sub>3</sub> 14,9 mmol/L; glicose 5,5 mmol/L; CaCl<sub>2</sub> 1,6 mmol/L; pH 7,4), sendo que o homogenato obtido foi centrifugado a 10.000 × g, a 4°C por 5 min. Para a montagem da placa, a cada 50 µL do sobrenadante obtido foram adicionados 50 µL de uma solução formada basicamente pelo reagente Amplex Red (10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine) e a peroxidase *horseradish* (HRP). O reagente Amplex Red na presença da HRP reage com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> presente em cada amostra, produzindo a resorufina, produto altamente fluorescente ( $\lambda$ excitação 571 nm,  $\lambda$ emissão 585 nm). Uma curva padrão de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi construída e os valores de concentração obtidos foram expressos em nmol/mg de proteína (SIMPLICIO et al., 2015).

### 3.9.4 Quantificação da geração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *in situ* em córtex renal de camundongos

Para a visualização *in situ* dos níveis intracelulares de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi utilizada a sonda diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA), que forma um composto intermediário por ação de esterases, o qual pode ser oxidado pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a um produto fluorescente, o diclorofluoresceína (DCF-DA). Apesar desse composto ser mais sensível ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (TONINI et al., 2013), outras espécies reativas podem oxidá-lo, tais como o NO e o ONOO<sup>-</sup> (WINTERBOURN, 2014). As amostras de córtex renal foram coletadas, embebidas em Tissue-Tek® - OCT™ (Sakura Finetek, Torrance, CA, EUA) e congeladas em nitrogênio líquido. Os tecidos foram cortados em criostato (5 µm de espessura) e incubados com DCFH-DA (1

$\mu\text{mol/L}$ ) diluído em PBS (pH 7,4) por 30 min em uma câmara úmida, escura e aquecida a 37°C. Os cortes foram lavados três vezes com PBS (pH 7,4) (MARCHI et al., 2016; DINIZ et al., 2017). Utilizando um microscópio de fluorescência acoplado à câmara fotográfica (Carl Zeiss Microscopy Ltd., Alemanha), as secções de córtex renal foram visualizadas utilizando os comprimentos de onda de 480 nm ( $\lambda$ excitação) e 510 nm ( $\lambda$ emissão). As imagens foram fotografadas em aumento de 400x e representam a produção qualitativa dos níveis de  $\text{H}_2\text{O}_2$  no córtex renal. Foi utilizado o *software ImageJ* (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA) para avaliar a intensidade de fluorescência, a qual foi quantificada pela média aritmética obtida em 10 campos por imagem. Os resultados foram expressos como intensidade de fluorescência (unidades arbitrárias).

### **3.9.5 Determinação dos níveis de nitrato/nitrito ( $\text{NO}_x$ ) em córtex renal de camundongos**

As amostras de córtex renal foram coletadas, congeladas em nitrogênio líquido e, posteriormente, homogeneizadas em PBS (pH 7,4) e centrifugadas a  $10.000 \times g$ , 20 min a 4°C. Os sobrenadantes foram ultrafiltrados com filtros específicos (#UFC5010BK, Amicon® Ultra – 0,5 mL 10 kDa, Millipore Corporation, Billerica, MA, EUA) em temperatura ambiente, a  $14.000 \times g$  por 30 min, e utilizados em ensaio colorimétrico para as dosagens de  $\text{NO}_x$  seguindo as instruções do kit (#780001, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, EUA). A detecção dos metabólitos do NO, nitrato e nitrito, é realizada por meio de um ensaio colorimétrico baseado na reação do nitrato/nitrito com o reagente de Griess, que tem como produto um diazo-composto de coloração rosa. As medidas das absorbâncias dos padrões e amostras (540 nm) foram obtidas e as concentrações de  $\text{NO}_x$  foram determinadas. Os resultados foram expressos em nmol/mg de proteína (GONZAGA et al., 2015).

### **3.9.6 Quantificação da geração de NO *in situ* em córtex renal de camundongos**

Para a avaliação da formação *in situ* de NO, tecidos de córtex renal foram incubados com a sonda diacetato de 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2DA). Dentro das células, o DAF-2DA é clivado por esterases intracelulares em 3,4-diaminofluoresceína (DAF-2). Este produto intermediário reage com o NO na presença de  $\text{O}_2$ , formando o triazolo-diaminofluoresceína (DAF-2T), um composto que emite uma fluorescência esverdeada (HALBACH, 2003). Para esta técnica, as amostras de córtex renal foram coletadas, embebidas em Tissue-Tek® - OCT™

(Sakura Finetek, Torrance, CA, EUA) e congeladas em nitrogênio líquido. Os tecidos foram cortados em criostato (5  $\mu\text{m}$  de espessura) e para a avaliação da produção de NO foram incubados com DAF-2DA (5  $\mu\text{mol/L}$ ) diluído em PBS (pH 7,4) por 30 min em uma câmara úmida, escura e aquecida a 37°C. Os cortes foram lavados três vezes com PBS (pH 7,4) (MARCHI et al., 2016; DINIZ et al., 2017). Utilizando um microscópio de fluorescência acoplado à câmera fotográfica (Carl Zeiss Microscopy Ltd., Alemanha), as secções de córtex renal foram visualizadas utilizando os comprimentos de onda de 490 nm ( $\lambda$ excitação) e 515 nm ( $\lambda$ emissão). As imagens foram fotografadas em aumento de 400x e representam a produção qualitativa de NO em córtex renal. Foi utilizado o *software ImageJ* (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA) para avaliar a intensidade de fluorescência, a qual foi quantificada pela média aritmética obtida em 10 campos por imagem. Os resultados foram expressos como intensidade de fluorescência (unidades arbitrárias).

### **3.9.7 Determinação de TBARS em córtex renal de camundongos**

As amostras de córtex renal foram coletadas e congeladas em nitrogênio líquido. As amostras de tecido foram homogeneizadas em tampão de RIPA (pH 7,4) e em seguida foram centrifugadas a  $1.600 \times g$  por 10 min a 4°C. As amostras foram aquecidas (100°C por 1 h) e em seguida centrifugadas novamente. O sobrenadante foi utilizado para posterior dosagem, que foi realizada seguindo as instruções do fabricante do kit (#10009055, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, EUA). O cálculo da concentração de TBARS foi feito por meio de uma curva padrão de bis-malondialdeído (MDA) e os resultados foram representados como TBARS (nmol/mg proteína) (SIMPLICIO et al., 2015).

### **3.10 Avaliação da capacidade antioxidante**

*Objetivo:* Avaliar se o consumo crônico de etanol altera a atividade enzimática de SOD, catalase e GPx, e os níveis de GSH e GSSG, e a participação da iNOS nessa resposta.

#### **3.10.1 Determinação da atividade enzimática da SOD em córtex renal de camundongos**

As amostras de córtex renal coletadas e congeladas em nitrogênio líquido foram homogeneizadas em PBS pH 7,4 e centrifugadas a  $1.500 \times g$ , 4°C por 12 min. A atividade da

SOD foi determinada seguindo as instruções de kit comercial (#19160, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). O ensaio é baseado na adição de 20 µL de sobrenadante à placa para iniciar a reação com o sal de tetrazólio. Quanto menor a atividade da SOD, maior a concentração de  $O_2^{\cdot-}$  na amostra, que por sua vez reage com o tetrazólio levando à formação de um produto cromogênico, o formazan, que possui coloração amarela, com absorbância monitorada a 450 nm. Os resultados foram expressos em % da taxa de inibição, ou seja, a capacidade da SOD em inibir a reação do  $O_2^{\cdot-}$  com o tetrazólio.

### **3.10.2 Determinação da atividade enzimática da catalase em córtex renal de camundongos**

As amostras de córtex renal coletadas e congeladas em nitrogênio líquido foram homogeneizadas em PBS (pH 7,4). Ao homogenato de tecido de córtex renal, foram adicionados 100 µL de tampão fosfato ( $K_2HPO_4$  0,1 mol/L,  $KH_2PO_4$  0,1 mol/L, pH 6,5) e centrifugados a  $7.800 \times g$  por 20 min a 4°C. A solução reação foi preparada pela adição de 2,5 mL de tampão Tris-EDTA, 47,3 mL de água Milli-Q® e 175,5 µL de  $H_2O_2$  (30 mmol/L) e mantida em banho-maria a 36°C. O ensaio foi 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  $H_2O_2$  foi medida durante 60 segundos. O valor inicial de absorbância foi subtraído do valor final obtido e os resultados foram expressos como nmol/min/mg proteína.

### **3.10.3 Determinação da atividade enzimática da glutathiona peroxidase (GPx) em córtex renal de camundongos**

As amostras de córtex renal, previamente coletadas e congeladas em nitrogênio líquido, foram homogeneizadas em tampão Tris-HCl (50 mmol/L, pH 7,5) contendo EDTA (5 mmol/L) e de DTT (1 mmol/L). Posteriormente, o homogenato foi centrifugado a  $10.000 \times g$  por 15 min a 4°C. A atividade da GPx foi avaliada seguindo as instruções do kit comercial *Glutathione Peroxidase Assay Kit*, (#703102, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Michigan, EUA), que se baseia em uma reação com a glutathiona redutase (GR). A glutathiona oxidada (GSSG) produzida pela redução de um hidroperóxido orgânico pela GPx é reciclada ao seu estado reduzido pela GR. A oxidação de NADPH a  $NADP^+$  é acompanhada por uma diminuição da absorbância avaliada em 340 nm. A taxa de redução da absorbância de cada amostra é



diretamente proporcional à atividade da GPx. Os resultados foram expressos em nmol/min/mg de proteína (MARCHI et al., 2016).

#### **3.10.4 Determinação dos níveis de GSH em córtex renal de camundongos**

As amostras de córtex renal coletadas e armazenadas em nitrogênio líquido foram homogeneizadas em PBS (pH 7,4). A cada 100  $\mu$ L de homogenato foram adicionados 100  $\mu$ L de ácido tricloroacético (TCA, 12,5%), permanecendo no gelo por 30 min e centrifugado a  $900 \times g$  por 15 min a 4°C. A montagem da placa foi realizada pela adição de 100  $\mu$ L de sobrenadante e 200  $\mu$ L de Tris-HCl. A cada poço foi incorporado 5  $\mu$ L de ácido 5,5-ditiobis-(2-nitrobenzóico) (DTNB; 3,96 mg em 1 mL de metanol), reagente que quando em contato com o grupo tiol (-SH) dos grupos sulfidrílicos do GSH, produz um composto de coloração amarela, o 5-tio-2-ácido nitrobenzóico (TNB), lido espectrofotometricamente a 415 nm. Os valores individuais foram interpolados em uma curva padrão de GSH e expressos em  $\mu$ g/mg de proteína (GONZAGA et al., 2014).

#### **3.10.5 Determinação dos níveis de GSSG em córtex renal de camundongos**

As amostras de córtex renal foram homogeneizadas em tampão MES [ácido 2-(N-morfolino) etanosulfônico 0,2 mol/L, fosfato 0,05 mol/L, EDTA 1 mmol/L, pH 6,0] e centrifugadas a  $10.000 \times g$ , 4°C por 15 min. O sobrenadante obtido foi desproteínizado com solução de ácido metafosfórico 10% (massa/vol.) e mantido a temperatura ambiente por 5 min. Em seguida, essas amostras foram centrifugadas a  $4.000 \times g$  por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi utilizado para a dosagem da concentração de GSSG seguindo as instruções do fabricante do kit (#703002, Glutathione Assay Kit, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, EUA). Os valores individuais foram interpolados em uma curva padrão de GSSG e expressos em  $\mu$ mol/L/mg de proteína.

### **3.11 Determinação da expressão de Nox (1,2,4), SOD (1,2,3), catalase, MMP (2,9), TIMP (1,2), eNOS, nNOS, fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2), NF- $\kappa$ B pelo método de *Western Blotting* em córtex renal de camundongos**

**Objetivo:** Verificar se o consumo crônico de etanol induz alteração na expressão proteica em córtex renal de camundongos, e a participação da iNOS nessa resposta.

### 3.11.1 Isolamento das frações nuclear e citosólica do NF- $\kappa$ B

Para determinar se o tratamento crônico com etanol induziu a ativação do complexo NF- $\kappa$ B, um fator de transcrição que se encontra na sua forma inativa no citoplasma, e quando ativado transloca-se para o núcleo, utilizamos a técnica de *western blotting*, a fim de obter a expressão proteica do NF- $\kappa$ B p65 nas frações nuclear e citosólica e no homogenato total.

Para a preparação das frações citosólicas e nucleares, as amostras de córtex renal foram homogeneizadas em tampão de lise A [Tris-HCl (100 mmol/L; pH 7,4), EDTA (1 mmol/L), KCl (10 mmol/L), MgCl<sub>2</sub> (30 mmol/L), EGTA (0,1 mmol/L), DTT (1 mmol/L), Triton X-100 (0,2%) e coquetel de inibidores]. As amostras foram centrifugadas a 10.000  $\times$  g por 10 min a 4°C. Os sobrenadantes obtidos correspondem às frações citosólicas. Em seguida, os sedimentos foram lavados duas vezes com tampão de lise A e ressuspensos em 150  $\mu$ l de tampão B [HEPES (20 mmol/L), NaCl (420 mmol/L), EGTA (0,1 mmol/L), EDTA (0,2 mmol/L), MgCl<sub>2</sub> (1,5 mmol/L), DTT (0,5 mmol/L), glicerol (25%) e coquetel de inibidores]. Os extratos foram agitados vigorosamente para completa homogeneização e centrifugados a 10.000  $\times$  g por 15 min a 4°C. Os sobrenadantes correspondem às frações nucleares (DIGNAM; LEBOVITZ; ROEDER, 1983; LEITE et al., 2017). Em seguida, foi realizada a técnica de *western immunoblotting* (descrita abaixo) no homogenato total e nas frações citosólica e nuclear para a subunidade p65 do NF- $\kappa$ B.

**Objetivo:** Verificar se o consumo crônico de etanol induz ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B, e a participação da iNOS nessa resposta.

### 3.11.2 Western Blotting

Os tecidos de córtex renal foram homogeneizados em tampão RIPA (pH 7,4) e centrifugados a 10.000  $\times$  g por 10 min a 4°C. Após a quantificação proteica dos sobrenadantes, foi realizado o preparo das amostras utilizando tampão Laemmli (6x). Em seguida, as amostras foram aquecidas por 5 min a 95°C. Uma alíquota de 100  $\mu$ g de proteína total de córtex renal foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida 7-12% por 1 h e 20 min a 150 V em aparelho para mini-gel (Mini Protean III, Bio-Rad, CA, EUA). Em seguida as proteínas foram

eletricamente transferidas para membrana de nitrocelulose (#10600004, Amersham™ Protran® Premium, 0.2 µm nitrocelulose, GE Healthcare, Life Science, Alemanha) a 100 V por 1 h e 30 min. A eficácia da transferência foi verificada pela coloração vermelho de Ponceau. As membranas foram incubadas em tampão tris salina (TBS-T) contendo Tris (10 mmol/L), NaCl (150 mmol/L), Tween 20 (0,02%) e, posteriormente, em leite desnatado (7%) por 1 h para reduzir a ligação inespecífica dos anticorpos às proteínas da membrana. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários descritos na Tabela 1 por 12 h a 4°C. Em seguida as membranas foram incubadas com anticorpo secundário ligado a peroxidase por 1 h e 30 min. Os sinais foram revelados pela exposição das membranas à solução de quimioluminescência (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce, IL, EUA) e captados pelo sistema de fotodocumentação da Bio-Rad (ChemiDoc™ XRS+). Depois de reveladas, as bandas foram submetidas à análise densitométrica óptica. Os resultados foram normalizados pela expressão da β-actina.

**Tabela 1.** Anticorpos primários e secundários, com suas respectivas diluições, utilizados para realização de *Western blotting*

Anticorpo	Código	Diluição	Anticorpo Secundário
Mox1 (H-15)	Santa Cruz Biotechnology sc-5821	1:250	Goat* 1:1000
gp91phox (c-15)	Santa Cruz Biotechnology sc-5827	1:500	Goat 1:1000
Nox4 (H-300)	Santa Cruz Biotechnology sc-30141	1:250	Rabbit** 1:1000
SOD1	Santa Cruz Biotechnology sc-8637	1:500	Goat 1:500
SOD2	Santa Cruz Biotechnology sc-30080	1:500	Goat 1:500
SOD3	Santa Cruz Biotechnology sc-32220	1:500	Goat 1:500
Catalase (F-17)	Santa Cruz Biotechnology sc-34285	1:500	Goat 1:1000
MMP2	Abcam ab110186	1:500	Rabbit 1:500
MMP9	Abcam ab38898	1:750	Rabbit 1:500
TIMP-1 (2A4)	Santa Cruz Biotechnology sc-21734	1:500	Rabbit 1:500
TIMP-2 (3A4)	Santa Cruz Biotechnology sc-21735	1:500	Rabbit 1:500
eNOS	BD Transduction BD610296	1:2000	Mouse*** 1:500
nNOS	Cell Signaling 4234S	1:250	Rabbit 1:500
NFκB p65	Santa Cruz Biotechnology sc-398442	1:500	Mouse 1:500
Nrf2 (H-300)	Santa Cruz Biotechnology sc-13032	1:250	Rabbit 1:500
β-actina	Santa Cruz Biotechnology sc-47778	1:1000	Mouse 1:1000

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

\*\*\*Jackson ImmunoResearch cod.115-035-003

### 3.12 Avaliação dos níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10 em córtex renal de camundongos

As amostras de córtex renal foram homogeneizadas em PBS (pH 7,4) e, em seguida, centrifugadas a  $10.000 \times g$  por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi separado e 100  $\mu$ L do mesmo foram utilizados para o ensaio de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) seguindo as

instruções do fabricante dos kits de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10 (#430904, #432604, #431304 e #431414, respectivamente, ELISA MAX Deluxe Sets, Biolegend, CA, EUA). Os resultados foram normalizados pela concentração proteica de cada amostra e representados como pg/mg de proteína.

*Objetivo: Verificar se o consumo crônico de etanol induz alteração dos níveis teciduais de citocinas pró e anti-inflamatórias, e avaliar a participação da iNOS nessa resposta.*

### **3.13 Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO) em córtex renal de camundongos**

A quantificação do acúmulo de neutrófilos no tecido renal foi avaliada pela determinação da atividade da enzima MPO. As amostras de córtex renal (100 mg) foram homogeneizadas em tampão EDTA-fosfato de sódio (NaCl 0,1 mol/L; NaPO<sub>4</sub> 0,02 mol/L; Na<sub>2</sub>EDTA 0,015 mol/L, pH 4,7), agitadas vigorosamente, e centrifugadas a  $9.600 \times g$  por 10 min a 4°C. O sedimento foi ressuspensionado em solução de lise hipotônica (NaCl 0,2% e NaCl 1,6% com glicose 5%) e centrifugado novamente. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi solubilizado em tampão fosfato de sódio (0,05 mol/L; pH 5,4), contendo 0,5% brometo de hexa-1,6-bis-deciltrimetilamônio (HTAB, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), detergente iônico importante para a solubilização da MPO, facilitando sua extração. As amostras passaram por três ciclos de congelamento-descongelamento em nitrogênio líquido. Posteriormente, as suspensões foram centrifugadas ( $9.600 \times g$ , 15 min, 4°C) e o sobrenadante foi utilizado para a medida da atividade da MPO. O ensaio foi realizado pela adição de 25  $\mu$ L das amostras a 25  $\mu$ L de substrato 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB 1,6 mmol/L, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), que foram incubados a 37°C por 5 min. Em seguida, 25  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,002% foram adicionados à placa, que foi novamente incubada a 37°C por 5 min. A reação foi paralisada pela adição de 25  $\mu$ L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4 mol/L. A leitura foi realizada em comprimento de onda de 450 nm em espectrofotômetro. A atividade da MPO foi expressa como unidades relativas D.O./100 mg de tecido.

*Objetivo: Verificar se o consumo crônico de etanol induz infiltração de neutrófilos e avaliar a participação da iNOS nessa resposta.*

### **3.14 Avaliação da atividade de MMP**

### **3.14.1 Determinação da atividade de MMP por zimografia em gel em córtex renal de camundongos**

A zimografia em gel é uma técnica utilizada para determinar a atividade de gelatinases, como a MMP-2 e a MMP-9. Essa metodologia se baseia na degradação do substrato de gelatina co-polimerizado com o gel de acrilamida.

*Objetivo: Verificar se o consumo crônico de etanol induz alteração da atividade gelatinolítica da MMP-2 e MMP-9, e avaliar a participação da iNOS nessa resposta.*

#### **3.14.1.1 Preparo das amostras**

As amostras de córtex renal foram trituradas sob congelamento em cadinho. O triturado do tecido renal foi homogeneizado em tampão de extração de proteínas (NaF 10 mmol/L, ortovanadato 1 mmol/L, coquetel de inibidor de protease Sigma® e tampão RIPA Sigma®, R0278) e incubado por 2 h a 4°C. Após este período, os extratos foram centrifugados a  $17.950 \times g$  por 10 min e 4°C. Os sobrenadantes foram armazenados no freezer -80°C até a dosagem proteica.

#### **3.14.1.2 Dosagem de proteína pelo método de Bradford**

Para a determinação da atividade gelatinolítica de MMPs, a concentração de proteína das amostras foram determinadas em espectrofotômetro a 595 nm, como descrito por Bradford (1976), utilizando-se o kit da Bio-Rad.

#### **3.14.1.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida 8%**

Os extratos de amostras de córtex renal foram previamente diluídos em tampão não-redutor (SDS 2%, Tris-HCl 125 mmol/L, glicerol 10% e azul de bromofenol 0,001%). Foram utilizadas 30 µg de proteínas de cada amostra. Após a diluição, as amostras foram aplicadas em géis de poliacrilamida 8% copolimerizada com gelatina (0,01%, Sigma G1890) e as proteínas de cada amostra foram separadas por eletroforese, conforme a técnica de SDS-PAGE. Após o tempo da eletroforese, os géis foram lavados duas vezes com solução de Triton X-100 a 2%, para remoção do SDS, e incubados em solução Tris-CaCl<sub>2</sub> 50 mmol/L (CaCl<sub>2</sub> 5 mmol/L, NaCl

150 mmol/L, pH 7,6), por 16 h a 37°C. Posteriormente, foram fixados e corados em solução Coomassie Blue 0,05% por 4 h. Para a visualização das bandas referentes as MMPs, os géis foram descorados com metanol a 30% e ácido acético a 10%. Observa-se a formação de bandas claras contra o fundo azul de Coomassie, devido à degradação da gelatina incorporada ao gel.

Para cada gel foi utilizado um padrão interno, o soro fetal bovino (SFB) a 2%. Por ele foi possível normalizar as quantidades de proteínas obtidas entre os géis, podendo compará-los entre si. A quantificação das bandas de degradação da gelatina por MMP-2 e MMP-9 foi feita por meio do *software ImageJ* (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA).

### **3.14.2 Determinação da atividade gelatinolítica de MMP *in situ* em córtex renal de camundongos**

Esse método reflete sobre a atividade gelatinolítica das MMPs diretamente no tecido. As amostras de córtex renal previamente incluídas em Tissue-Tek® - OCT™ (Sakura Finetek, Torrance, CA, EUA) foram cortadas em 5 µm de espessura em criostato. As secções de tecido foram incubadas com o substrato dye-quenched (DQ) Gelatin (diluição 1:10, #E12055, Molecular Probes, Oregon, EUA) na concentração de 1 µg/mL em tampão de ativação Tris-CaCl<sub>2</sub> 50 mmol/L (pH 7,6) por 1 h a 37°C em câmara escura úmida. Após a incubação, os cortes foram lavados com PBS (0,1 mol/L; pH 7,2-7,4) e incubadas com 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI, diluição 1:1000). Com auxílio de microscópio de fluorescência (Leica DMI6000B, Heerbrugg, Suíça) acoplado a câmera fotográfica, as imagens dos cortes foram fotografadas num aumento de 400x. A quantificação da atividade gelatinolítica *in situ* observada como intensidade de fluorescência verde emitida foi determinada em 40 campos e realizada utilizando o *software ImageJ* (National Institute of Health, NIH, EUA). A atividade gelatinolítica de MMPs foi expressa em valores de média de intensidade de fluorescência por amostra. Cortes de córtex renal não incubados com o substrato foram utilizados como controle negativo.

**Objetivo:** *Verificar se o consumo crônico de etanol induz alteração da atividade gelatinolítica in situ de MMPs, e avaliar a participação da iNOS nessa resposta.*

### **3.15 Estudo morfológico em córtex renal de camundongos**

Para o estudo morfológico do córtex renal, camundongos foram perfundidos com tampão fosfato e PFA 4%. As amostras renais foram fixadas em formol tamponado a 10%,

seccionadas a partir do córtex em direção à pelve renal e incluídas em parafina. Os tecidos emblocados foram armazenados em geladeira até a realização dos ensaios de histologia e imuno-histoquímica.

### 3.15.1 Histologia

Foram realizadas preparações histológicas com secções de 6 µm e coradas com hematoxilina & eosina (H&E). Foi então realizada a avaliação histopatológica, onde se contemplou: proliferação endotelial, presença de células inflamatórias, congestão vascular, depósito de colágeno ou de proteínas e edema. Foram avaliados 10 campos por animal, no aumento de 40x através de microscópio óptico (Zeiss, Axioskop 2 plus, Jena, Germany). As imagens foram fotografadas a 20x, usando câmera digital AxioCam Hrc® (Zeiss).

***Objetivo:** Verificar se o consumo crônico de etanol induz alterações morfológicas em animais WT e avaliar a participação da iNOS nessa resposta.*

### 3.15.2 Imuno-histoquímica

Secções adicionais de 6 µm de espessura das amostras renais foram preparadas em lâminas recobertas com poli-lisina. As preparações foram então desparafinizadas em xilol, hidratadas por meio da imersão em álcool (95%, 90%, 75%, 70%) e lavados em água destilada. A recuperação antigênica foi realizada em tampão citrato (0,01 mol/L; pH 6,0), sendo as lâminas mantidas em Steamer (panela de cozimento à vapor) a 98°C durante 40 min. Após a reativação dos sítios antigênicos, realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena com a aplicação do Bloqueador de Peroxidase (#DHP-125, Reveal™, Spring Bioscience, Pleasanton, CA, EUA) por 15 min. O bloqueio das ligações inespecíficas foi feito com Protein Block (#DPB-125, Reveal™, Spring Bioscience, Pleasanton, CA, EUA) por 10 min à temperatura ambiente. Em seguida, os cortes foram incubados com o anticorpo primário anti-iNOS (diluição 1:100; N7782; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) durante 60 min em temperatura ambiente. Após incubação, estes foram lavados com PBS e incubados com os reagentes Complement (10 min) (#DCMT-125, Reveal™, Spring Bioscience, Pleasanton, CA, EUA) e Conjugado HRP (15 min) (#DHRR-125, Reveal™, Spring Bioscience, Pleasanton, CA, EUA). As secções foram coradas com 3,3'-diaminobenzidina (DAB), e montadas para a análise imuno-histoquímica. As amostras foram contra-coradas com hematoxilina de Mayer e



montadas com Permount (Fischer Scientific, PA, EUA). Para o controle positivo foram utilizados cortes histológicos de fígado e para controle negativo se procedeu a omissão do anticorpo primário. Foram obtidas imagens randômicas no aumento de 20x por animal através da câmera digital AxioCam Hrc® (Zeiss). O percentual de imunomarcção foi avaliado pela média da porcentagem de área marcada em 10 campos de grande aumento (*high power fields* ou HPF) por animal utilizando-se o *software ImageJ* (National Institute of Health, NIH, EUA). A imunorreatividade para iNOS foi avaliada como a porcentagem de marcação positiva/HPF.

**Objetivo:** *Verificar se o consumo crônico de etanol induz a enzima iNOS.*

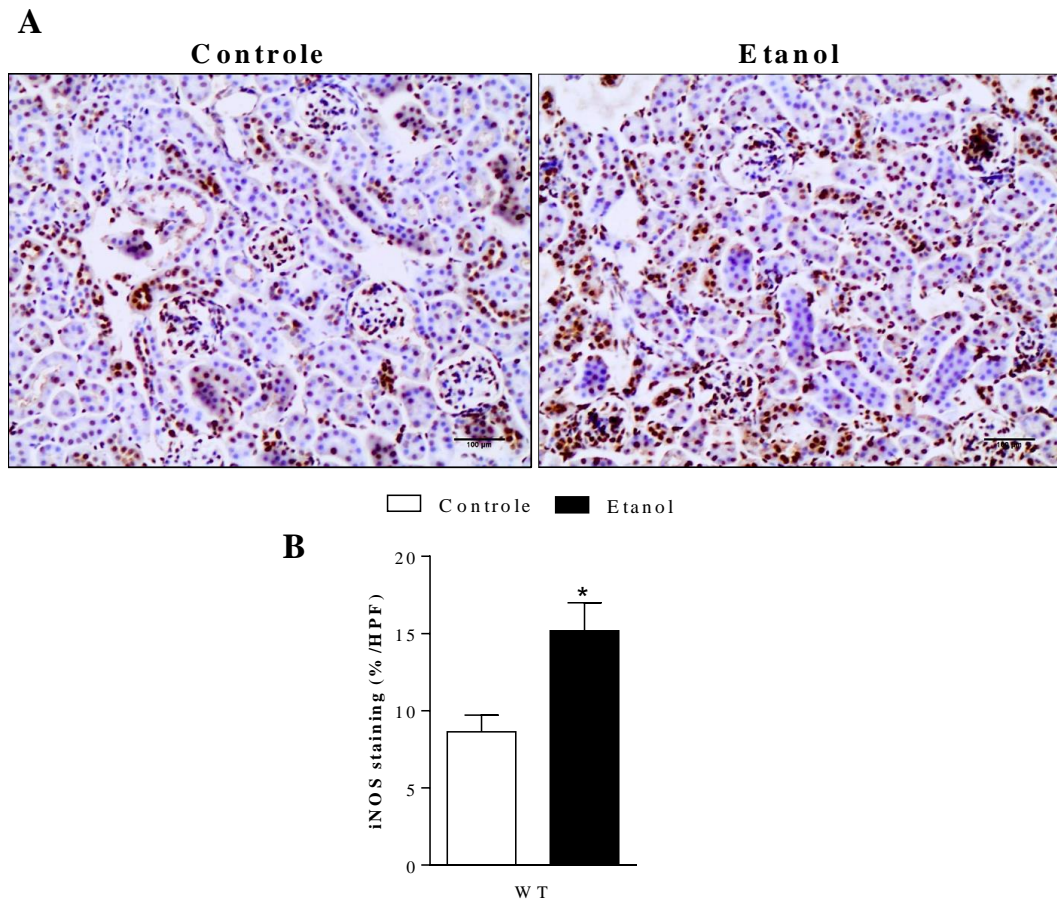
### **3.16 Análise estatística**

Os resultados foram analisados com o programa *GraphPad Prism*® (versão 6.0 para Windows, *GraphPad Software Inc.*, San Diego, CA, EUA). O teste “t” de Student não pareado foi usado para comparar os níveis sanguíneos de etanol e a expressão imuno-histoquímica de iNOS. A análise dos demais experimentos foi realizada por análise de variância de duas vias (*two-way ANOVA*) seguida pelo pós-teste de Bonferroni. Foram considerados estatisticamente diferentes valores com  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a expressão de iNOS em córtex renal de camundongos WT

Os níveis de iNOS foram avaliados pelo método de imuno-histoquímica. Nossos resultados mostraram que a expressão da iNOS foi significativamente maior no córtex renal de camundongos WT tratados com etanol, quando comparados ao grupo controle. Este aumento dos níveis de iNOS foi observado tanto nos glomérulos quanto nos túbulos renais (Figura 3).



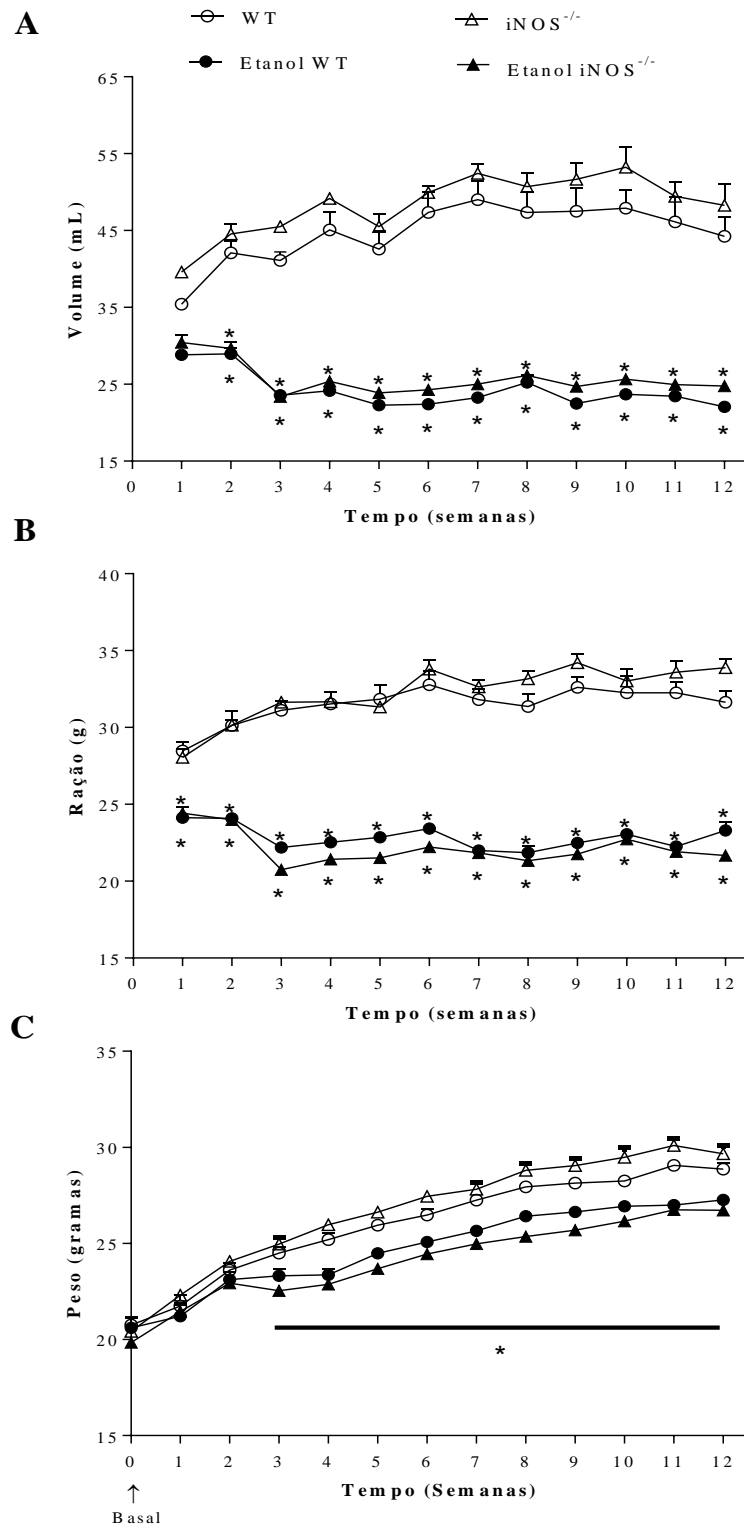
**Figura 3. Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a expressão de iNOS em córtex renal de camundongos WT.** A expressão de iNOS foi avaliada pela técnica de imuno-histoquímica. (A) Fotomicrografias representativas de córtex renal (Aumento: 200x) imunomarcadas com anticorpo primário anti-iNOS. (B) Representação gráfica da expressão de iNOS, quantificada analisando a intensidade de marrom. Valores expressos como média  $\pm$  EPM (n=3-4 por grupo). \*Diferença significativa em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ; teste *t* de Student não pareado).

#### **4.2 Medida dos níveis sanguíneos de etanol**

O etanol foi detectado no sangue dos camundongos WT e iNOS<sup>-/-</sup> tratados com etanol (n=6 por grupo). As concentrações determinadas foram  $260 \pm 61$  mg/dL (56,4 mmol/L) e  $269,8 \pm 33$  mg/dL (58,5 mmol/L) nos grupos WT e iNOS<sup>-/-</sup>, respectivamente. Não houve diferença significativa na concentração sanguínea de etanol entre os grupos. Não foram detectados níveis plasmáticos de etanol em camundongos dos grupos controles (WT ou iNOS<sup>-/-</sup>).

#### **4.3 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a evolução temporal do consumo líquido, de ração e do peso dos animais**

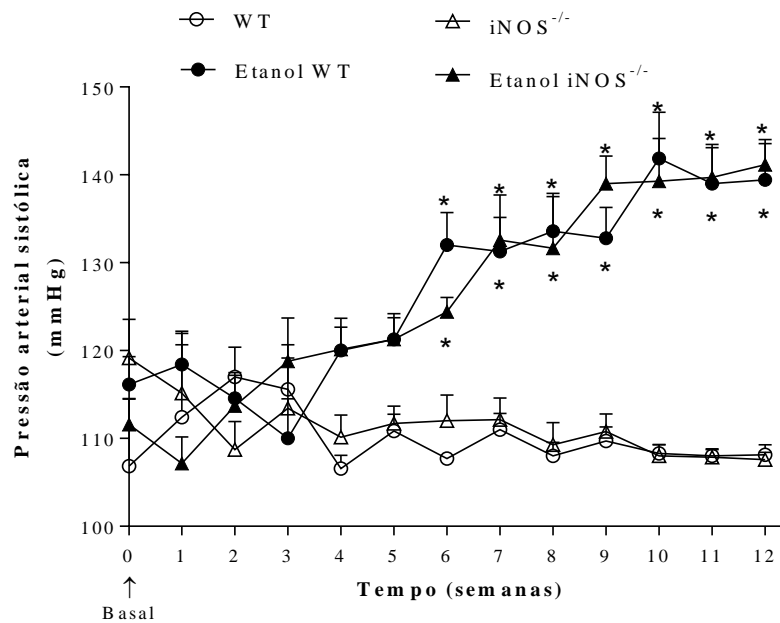
O consumo de ração e a ingestão líquida pelos camundongos dos quatro grupos experimentais foram avaliados semanalmente, e uma estimativa desses consumos foi realizada por meio da divisão do consumo total pelo número de animais por caixa. Nos camundongos que receberam etanol 20% (vol./vol.) foi observada redução significativa do consumo líquido e de ração em comparação aos grupos que receberam água (Figuras 4A e B). Esses animais apresentaram um consumo semanal de solução de etanol 20% (vol./vol.) de, aproximadamente, 25 mL, correspondendo a um consumo diário de 0,56 g de etanol. Além disso, uma estimativa do ganho de peso também foi realizada, sendo que os animais dos grupos tratados com etanol apresentaram redução no ganho de massa, quando comparados aos respectivos grupos controles (Figura 4C).



**Figura 4. Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a ingestão de líquido, o consumo de ração e o peso corporal dos camundongos.** O consumo líquido (mL) (A), consumo de ração (g) (B) e o peso (g) (C) dos animais foram avaliados por 12 semanas. Os pontos representam a média  $\pm$  EPM (n=18 por grupo). \*Diferença significativa em relação aos grupos controle WT e iNOS<sup>-/-</sup> ( $p < 0,05$ ; two-way ANOVA seguida pelo pós-teste de Bonferroni).

#### 4.4 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a pressão arterial sistólica

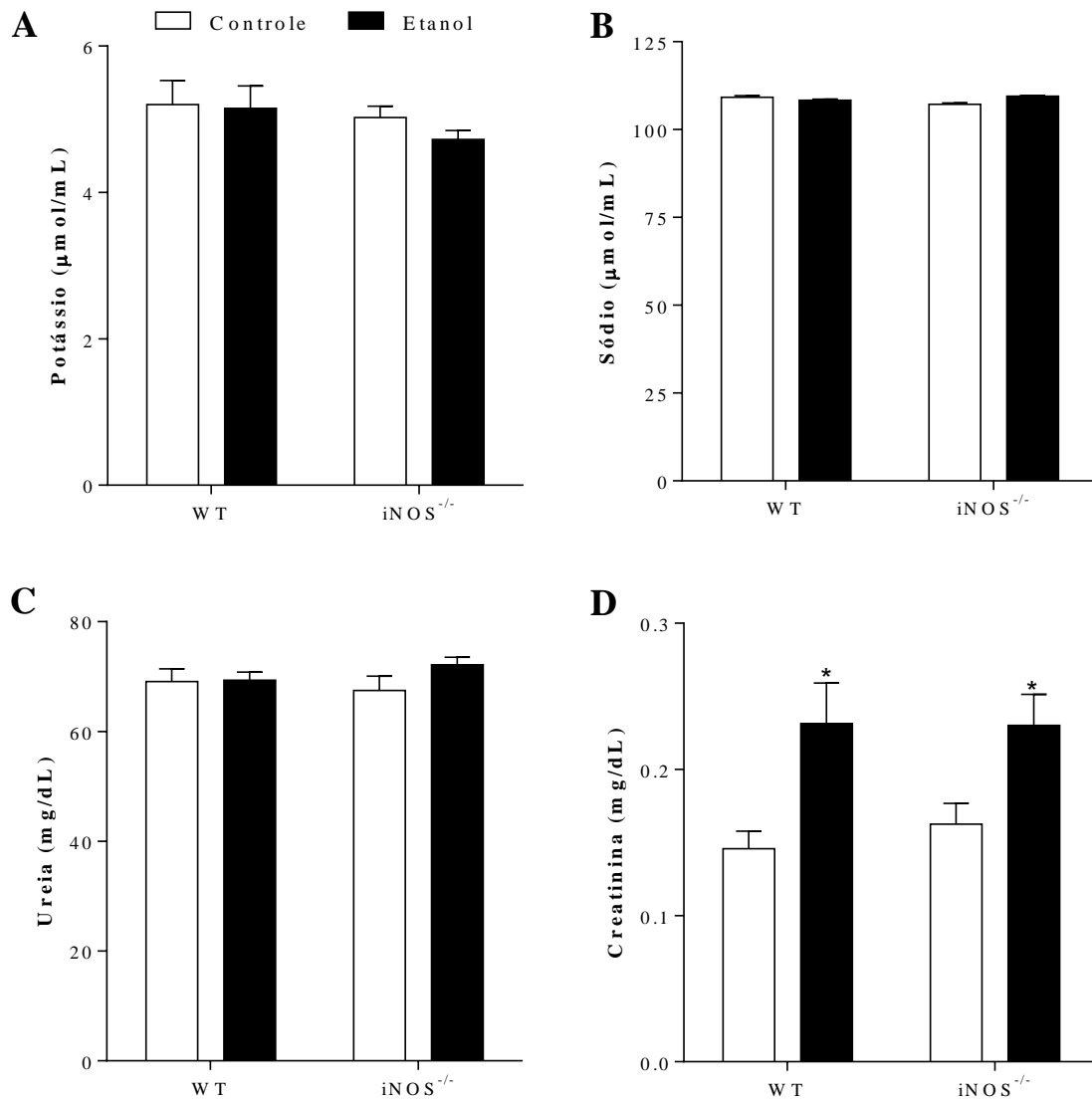
Os valores basais de PAS foram similares nos grupos experimentais antes do início do tratamento. Porém, a partir da sexta semana, observou-se aumento da PAS nos grupos tratados cronicamente com etanol, quando comparados aos animais dos grupos controle WT e  $iNOS^{-/-}$  (Figura 5).



**Figura 5. Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a pressão arterial sistólica.** A PAS foi determinada pelo método não invasivo da pletismografia de cauda por 12 semanas. Os pontos representam a média  $\pm$  EPM ( $n=7$  por grupo). \*Diferença significativa em relação aos grupos controle WT e  $iNOS^{-/-}$  ( $p<0,05$ ; *two-way* ANOVA seguida pelo pós-teste de Bonferroni).

#### 4.5 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a função renal

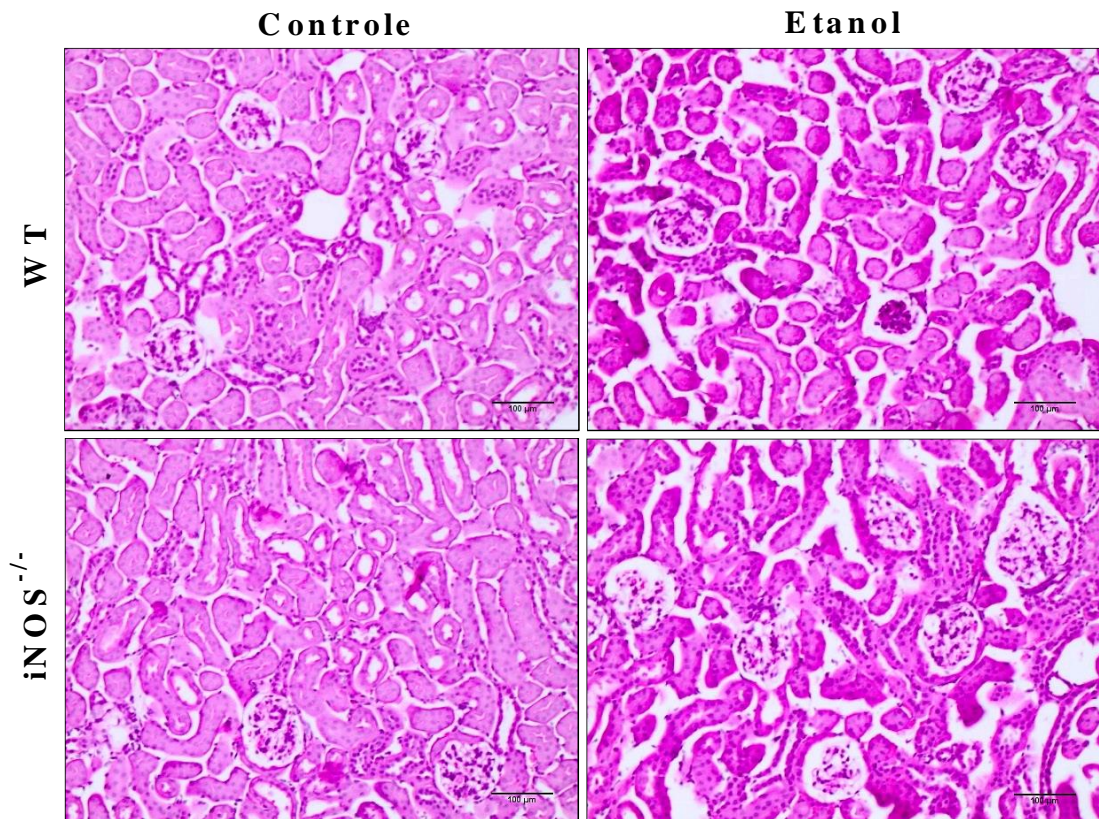
A função renal dos animais dos quatro grupos experimentais foi avaliada por meio dos níveis séricos de potássio, sódio, ureia e creatinina. O tratamento crônico com etanol não alterou as concentrações de potássio, sódio e ureia (Figuras 6A, B e C). No entanto, foi observado aumento dos níveis séricos de creatinina em camundongos WT e  $iNOS^{-/-}$  tratados com etanol (Figura 6D).



**Figura 6. Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a função renal de camundongos WT e iNOS<sup>-/-</sup>.** A função renal foi avaliada, nos quatro grupos experimentais, pela medida dos níveis séricos de potássio (A), sódio (B), ureia (C) e creatinina (D). Os resultados são expressos como a média  $\pm$  EPM (n=5-8 por grupo). \*Diferença significativa em relação aos grupos controle WT e iNOS<sup>-/-</sup> (p<0,05; two-way ANOVA seguida pelo pós-teste de Bonferroni).

#### 4.6 Estudo das alterações histopatológicas em córtex renal de camundongos

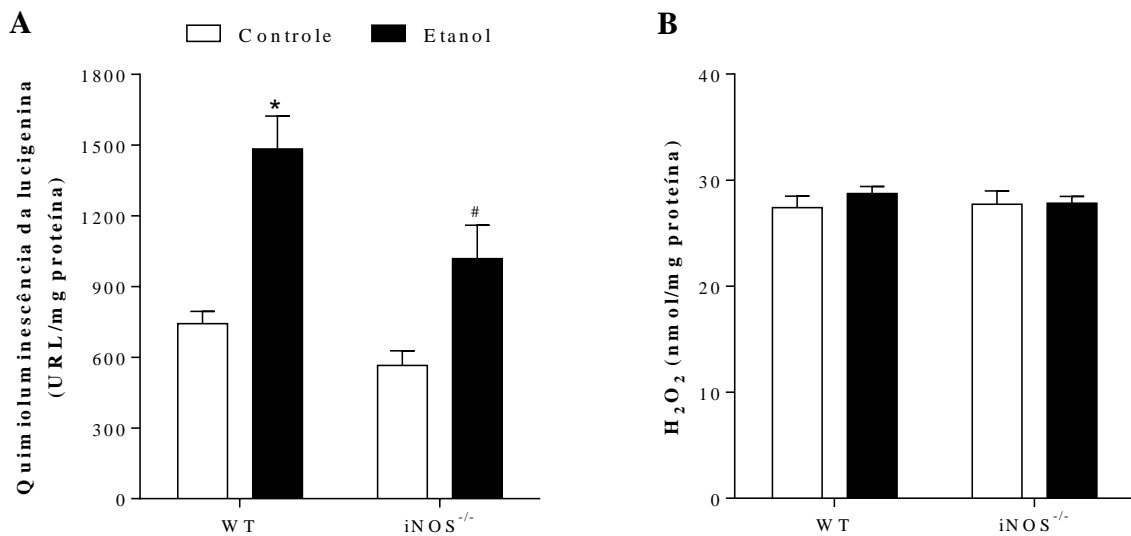
As alterações histopatológicas do córtex renal foram avaliadas em cortes histológicos corados com H&E. Ao analisar as alterações morfológicas do tecido renal, observamos aumento do diâmetro dos glomérulos e edema intersticial no córtex renal de camundongos WT e iNOS<sup>-/-</sup> tratados cronicamente com etanol (Figura 7).



**Figura 7.** Efeito do consumo crônico de etanol sobre as mudanças morfológicas de córtex renal de camundongos WT e  $iNOS^{-/-}$ . Os cortes histológicos de córtex renal, corados por hematoxilina e eosina (H&E), foram examinados em microscópio ótico. Fotomicrografias representativas de córtex renal (Aumento: 200x). Valores expressos como média  $\pm$  EPM (n=4-5 por grupo).

#### 4.7 Determinação dos níveis teciduais de EROs em córtex renal

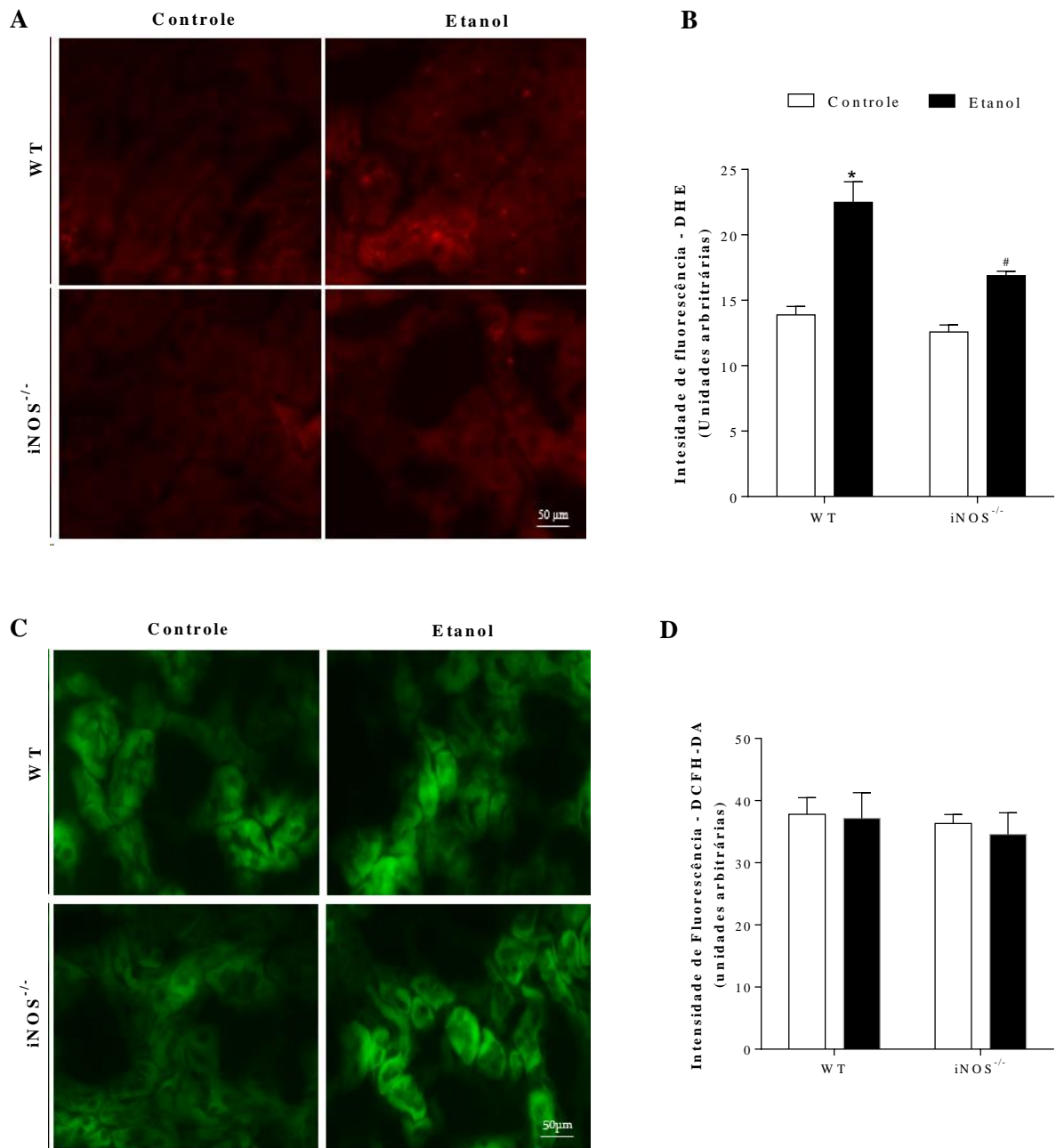
Os camundongos dos grupos tratados com etanol (WT e  $iNOS^{-/-}$ ) apresentaram aumento na formação de  $O_2^{\bullet -}$  no córtex renal quando comparados aos respectivos grupos controle. Porém, os níveis encontrados em camundongos  $iNOS^{-/-}$  tratados com etanol foram menores, quando comparados aos animais WT (Figura 8A). Na Figura 8B estão amostrados os valores da concentração de  $H_2O_2$  encontrados em córtex renal de camundongos dos quatro grupos experimentais. Após tratamento crônico com etanol não foram observadas alterações significativas nos níveis de  $H_2O_2$  (Figura 8B).



**Figura 8. Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a formação de  $O_2^{\cdot -}$  e  $H_2O_2$  em córtex renal de camundongos WT e  $iNOS^{-/-}$ .** (A) A produção de  $O_2^{\cdot -}$  foi avaliada pelo método de quimioluminescência da lucigenina. (B) A concentração de  $H_2O_2$  foi mensurada por fluorimetria utilizando o reagente de *Amplex Red*. O tratamento com etanol aumentou os níveis de  $O_2^{\cdot -}$  no córtex renal dos animais WT e  $iNOS^{-/-}$ . O consumo de etanol não alterou os níveis de  $H_2O_2$ . Os resultados são expressos como a média  $\pm$  EPM (n= 7-9 por grupo). \*Diferença significativa em relação aos demais grupos #Diferença significativa em relação ao grupo  $iNOS^{-/-}$  (p<0,05; *two-way* ANOVA seguida pelo pós-teste de Bonferroni).

Na figura 9A estão representadas fotomicrografias de córtex renal de camundongos para visualização *in situ* da geração de ERO com a sonda DHE. O tratamento com etanol aumentou a formação de ERO no córtex renal de camundongos tratados, porém os animais  $iNOS^{-/-}$  apresentaram menor intensidade de fluorescência em relação ao grupo etanol WT (Figura 9B). Os níveis intracelulares de  $H_2O_2$  também foram avaliados pela técnica de fluorescência, utilizando a sonda DCFH-DA (Figura 9C). Porém, não observamos alteração da intensidade de fluorescência entre os quatro grupos experimentais (Figura 9D).

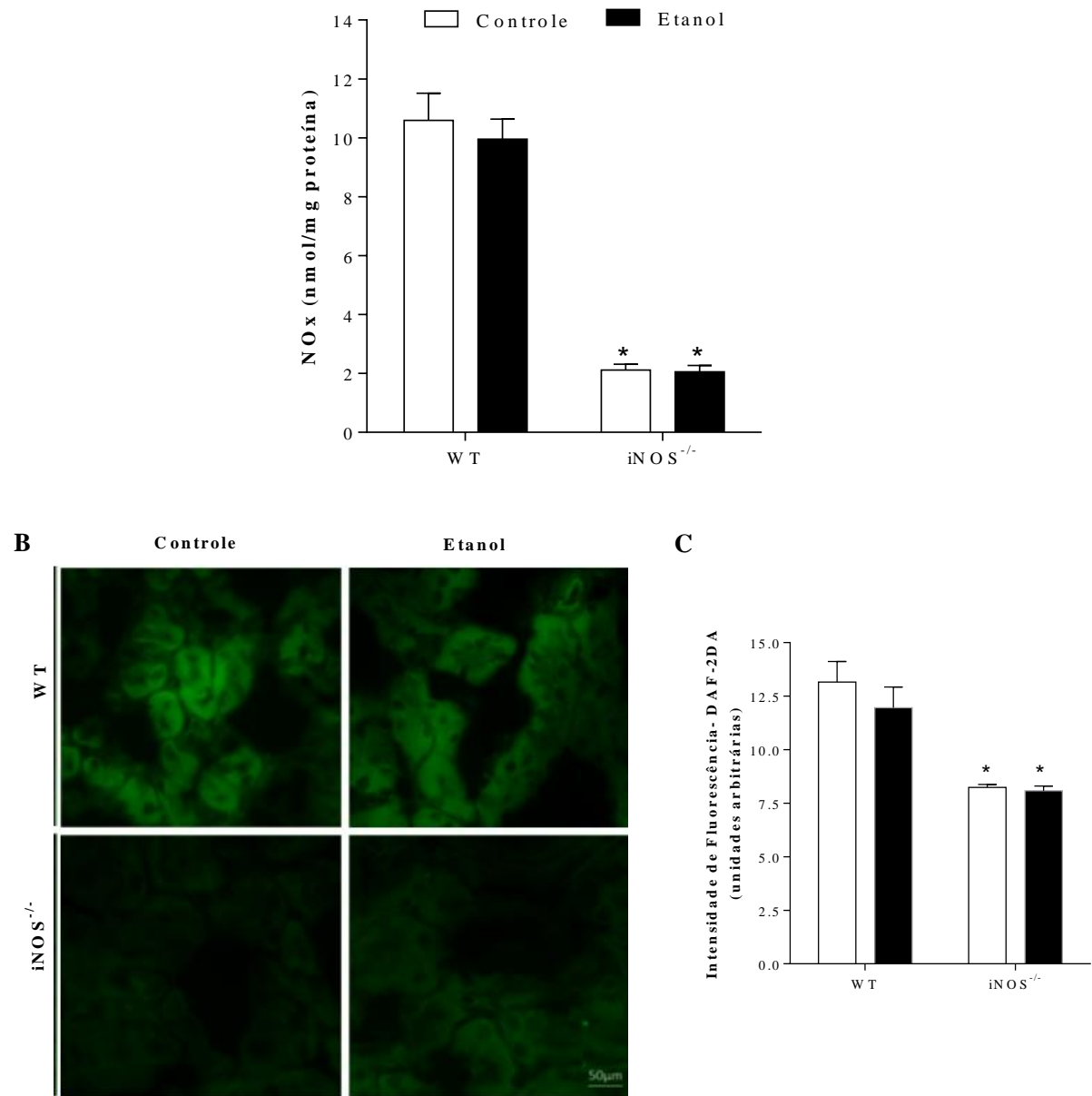




**Figura 9. Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a geração de ERO *in situ* em córtex renal de camundongos WT e iNOS<sup>-/-</sup>.** (A) Visualização *in situ* da geração de ERO pela sonda fluorescente dihidroetídeo (DHE). (B) Gráfico de barras demonstrando os valores de intensidade de fluorescência de DHE expressos pela média  $\pm$  EPM (n= 4 por grupo). (C) Visualização *in situ* da geração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pela sonda diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA). (D) Gráfico de barras demonstrando os valores de intensidade de fluorescência de DCFH-DA expressos pela média  $\pm$  EPM (n= 4 por grupo). O tratamento com etanol aumentou a geração de ERO, porém, animais iNOS<sup>-/-</sup> apresentaram menor aumento da fluorescência em relação ao grupo etanol WT. Consumo de etanol não alterou os níveis intracelulares de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. \*Diferença significativa em relação aos demais grupos #Diferença estatística em relação ao grupo iNOS<sup>-/-</sup> (p<0,05; two-way ANOVA seguida pelo pós-teste de Bonferroni).

#### **4.8 Determinação dos níveis teciduais de ERNs em córtex renal**

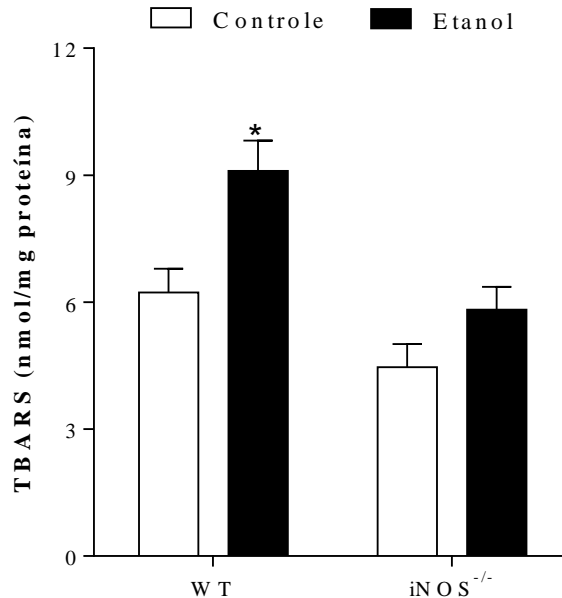
O tratamento crônico com etanol não alterou a concentração de NO<sub>x</sub> em córtex renal. Entretanto, os animais iNOS<sup>-/-</sup> apresentaram concentrações menores quando comparado aos níveis encontrados nos grupos controle e etanol WT (Figura 10A). Os mesmos resultados foram observados pela técnica de fluorescência, utilizando a sonda DAF-2DA (Figuras 10B e C). Na figura 10B estão representadas as fotomicrografias de córtex renal de camundongos dos quatro grupos tratados.



**Figura 10. Efeito do tratamento crônico com etanol sobre os níveis de nitrato/nitrito (NO<sub>x</sub>) em córtex renal de camundongos WT e iNOS<sup>-/-</sup>.** (A) A concentração de NO<sub>x</sub> foi avaliada utilizando kit colorimétrico. Os valores representam a média ± EPM (n=8-10 por grupo). (B) Visualização *in situ* da geração de NO<sub>x</sub> pela sonda fluorescente DAF-2DA. (C) Gráfico de barras demonstrando os valores de intensidade de fluorescência de DAF-2DA expressos pela média ± EPM (n= 4 por grupo). O tratamento com etanol não alterou os níveis de NO<sub>x</sub> em córtex renal de animais WT. Os animais iNOS<sup>-/-</sup> apresentaram concentrações reduzidas de nitrato e nitrito. \*Diferença significativa em relação aos grupos controle e etanol WT (p<0,05; two-way ANOVA seguida pelo pós-teste de Bonferroni).

#### 4.9 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre os níveis de lipoperoxidação em córtex renal

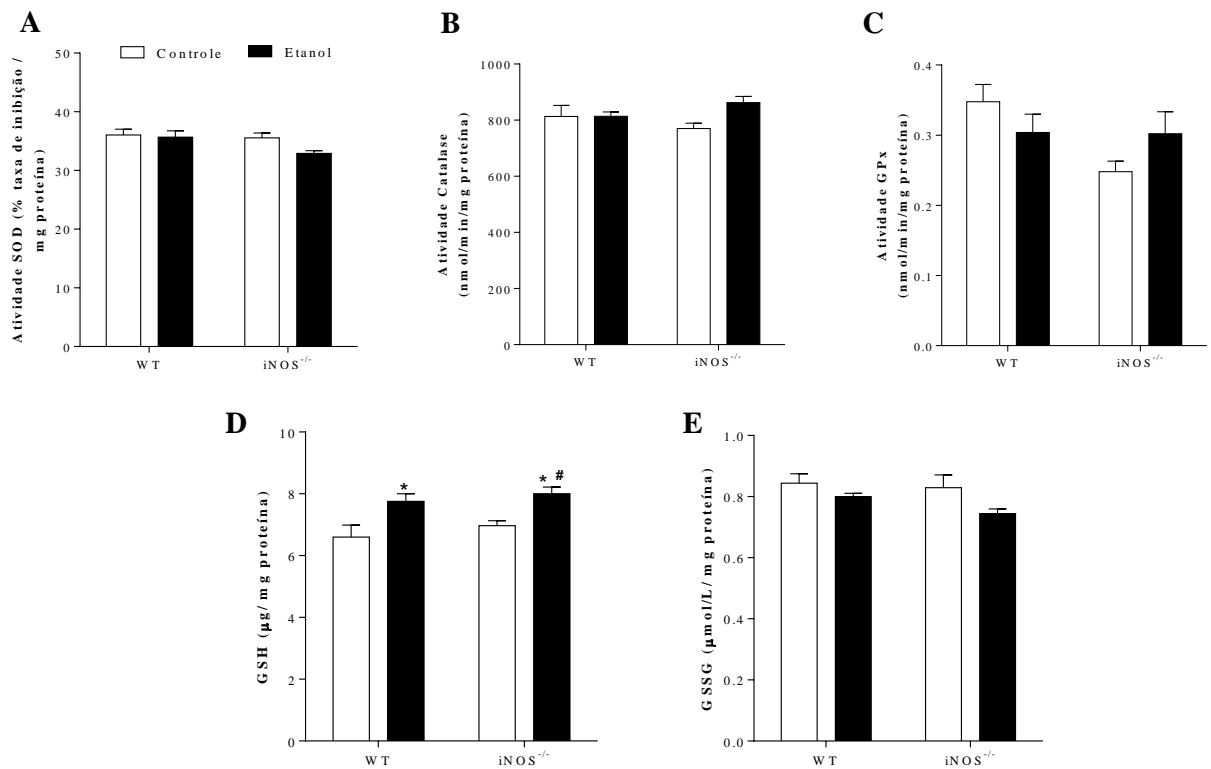
O tratamento crônico com etanol aumentou os níveis de TBARS em córtex renal de animais WT e este aumento não foi observado nos animais  $iNOS^{-/-}$  (Figura 11).



**Figura 11. Efeito do tratamento crônico com etanol sobre os níveis teciduais de TBARS em córtex renal de camundongos WT e  $iNOS^{-/-}$ .** Os níveis de TBARS foram avaliados utilizando kit colorimétrico. O tratamento com etanol aumentou os níveis de TBARS em córtex renal. Os animais  $iNOS^{-/-}$  não apresentaram este aumento após tratamento com etanol. Os valores representam a média  $\pm$  EPM (n=7-9 por grupo). \*Diferença significativa em relação aos grupos controle WT,  $iNOS^{-/-}$  e etanol  $iNOS^{-/-}$  ( $p < 0,05$ ; *two-way* ANOVA seguida pelo pós-teste de Bonferroni).

#### 4.10 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre os sistemas antioxidantes enzimático e não enzimático em córtex renal de camundongos

Observou-se que o tratamento com etanol não promoveu alteração da atividade das enzimas antioxidantes SOD, catalase nem GPx no córtex renal dos animais WT e  $iNOS^{-/-}$  (Figuras 12A, B e C). O sistema antioxidante não enzimático foi avaliado por meio da determinação dos níveis teciduais de GSH e GSSG. O córtex renal de camundongos WT e  $iNOS^{-/-}$  tratados com etanol apresentaram aumento da concentração de GSH (Figura 12D), porém os níveis de GSSG não foram alterados (Figura 12E).

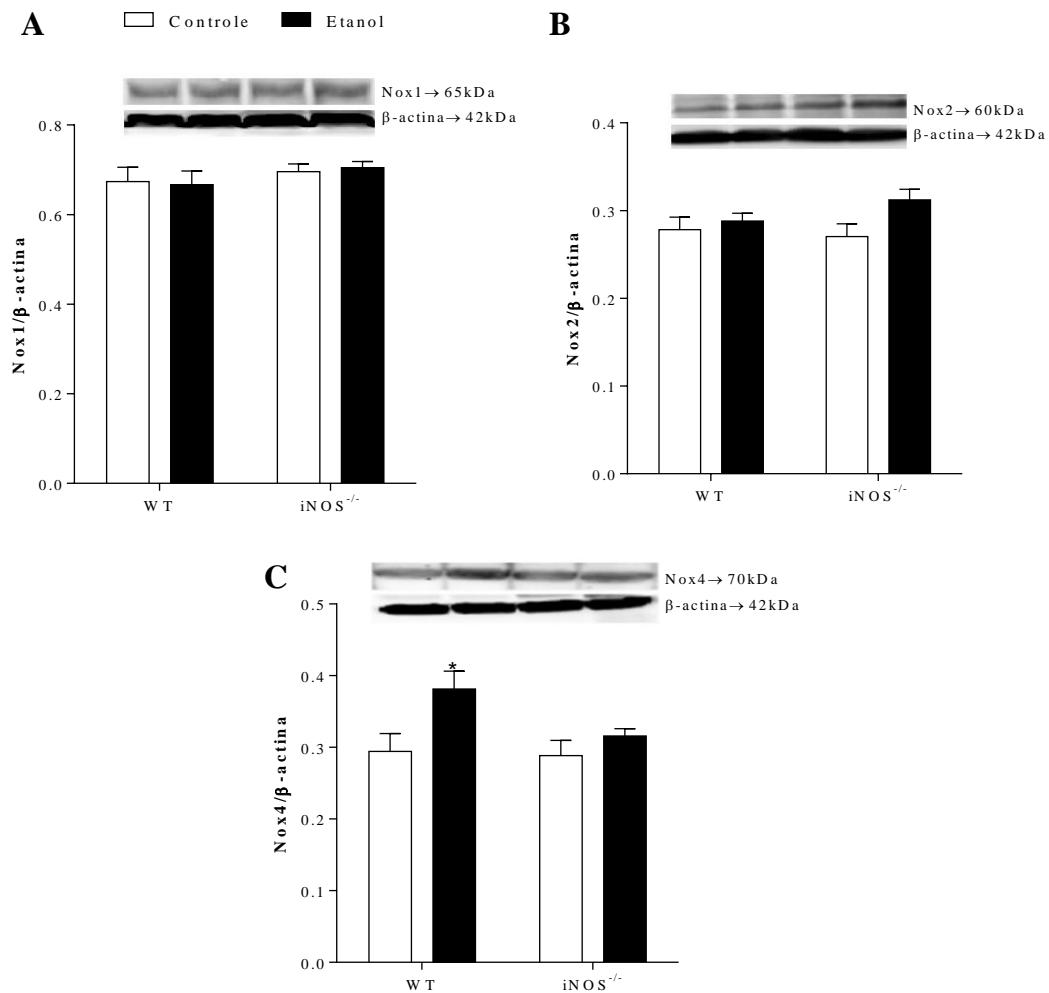


**Figura 12. Efeito do tratamento crônico com etanol sobre os sistemas antioxidantes enzimático e não enzimático em córtex renal de camundongos WT e *iNOS*<sup>-/-</sup>.** As atividades da SOD (A) e da GPx (C) e os níveis de GSH (D) e GSSG (E) foram avaliados por kit colorimétrico; enquanto a atividade da catalase (B) foi avaliada por espectrofotometria. O tratamento com etanol não alterou a atividade das enzimas antioxidantes SOD, catalase e GPx. O consumo de etanol induziu aumento dos níveis de GSH no córtex renal dos animais WT e *iNOS*<sup>-/-</sup>. Os valores representam a média ± EPM (n=6-10 por grupo). \*Diferença significativa em relação ao grupo controle WT. #Diferença significativa em relação ao grupo *iNOS*<sup>-/-</sup> (p<0,05; *two-way* ANOVA seguida pelo pós-teste de Bonferroni).

#### 4.11 Avaliação da expressão proteica em córtex renal

##### 4.11.1 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a expressão proteica da Nox1, Nox2 e Nox4

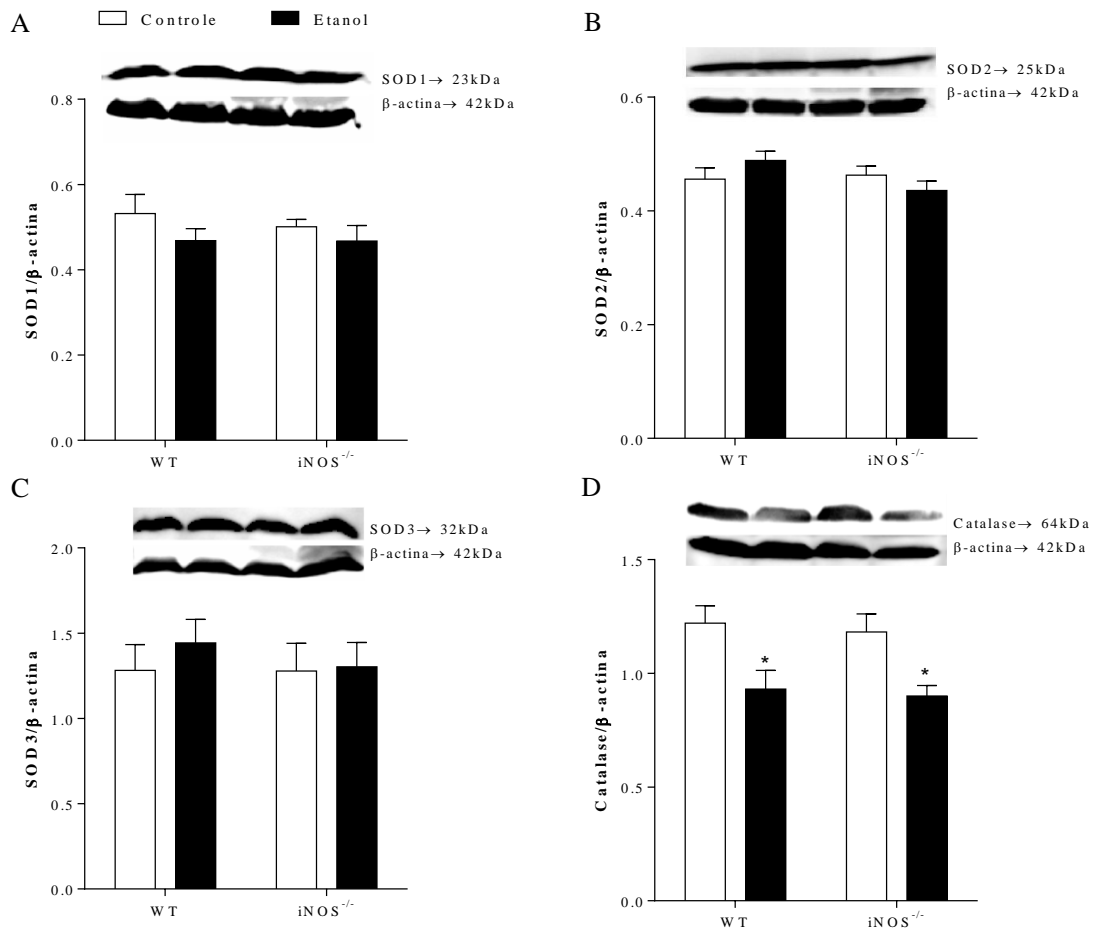
A expressão das subunidades catalíticas Nox1 e Nox2 não foi alterada nos camundongos que consumiram o etanol (Figuras 13A e B). Contudo, a expressão proteica da Nox4 em córtex renal de camundongos WT apresentou-se aumentada após o tratamento, sendo que este aumento não foi observado em animais *iNOS*<sup>-/-</sup> (Figura 13C).



**Figura 13. Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a expressão proteica da Nox1, Nox2 e Nox4 em córtex renal de camundongos WT e iNOS<sup>-/-</sup>.** *Painel superior:* imagens representativas da expressão das subunidades Nox1 (A), Nox2 (B) e Nox4 (C) obtidas por *Western Blotting*. *Painel inferior:* gráfico de barras demonstrando os valores expressos pela média  $\pm$  EPM da densidade óptica relativa (n=4-6 por grupo). Os valores foram normalizados pelos correspondentes de  $\beta$ -actina. \*Diferença em relação aos grupos controle WT, iNOS<sup>-/-</sup> e etanol iNOS<sup>-/-</sup> (p<0,05; *two-way* ANOVA seguida pelo pós-teste de Bonferroni).

#### 4.11.2 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a expressão proteica das enzimas antioxidantes SOD1, SOD2, SOD3 e catalase

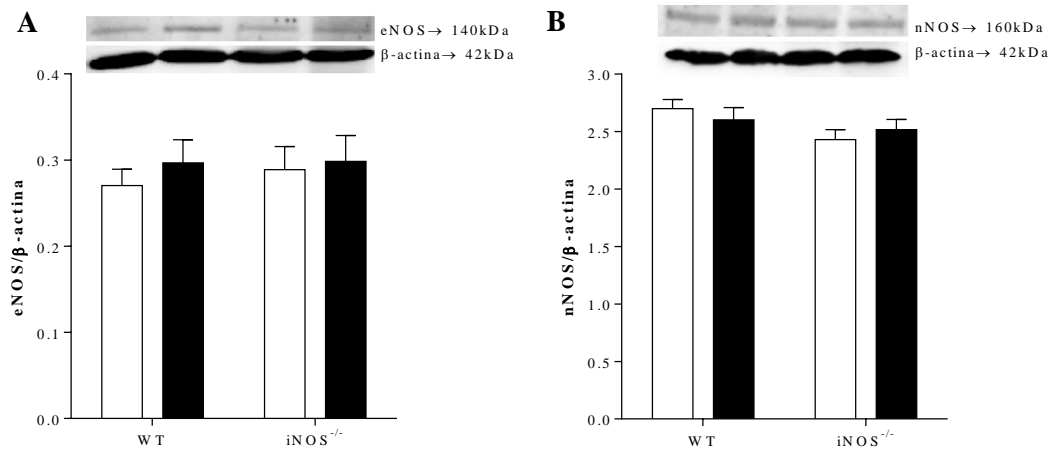
A expressão proteica das isoformas SOD1, SOD2 e SOD3 (Figuras 14A, B e C) não foi alterada após tratamento crônico com etanol. Contudo, o córtex renal de camundongos dos grupos tratados com etanol (WT e iNOS<sup>-/-</sup>) apresentaram redução da expressão da enzima antioxidante catalase (Figura 14D).



**Figura 14.** Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a expressão proteica das enzimas antioxidantes SOD1, SOD2, SOD3 e catalase em córtex renal de camundongos WT e iNOS<sup>-/-</sup>. *Painel superior:* imagens representativas da expressão das enzimas SOD1 (A), SOD2 (B), SOD3 (C) e da catalase (D) obtidas por *Western Blotting*. *Painel inferior:* gráfico de barras demonstrando os valores expressos pela média  $\pm$  EPM da densidade óptica relativa (n=4-6 por grupo). Os valores foram normalizados pelos correspondentes de  $\beta$ -actina. \*Diferença significativa em relação aos grupos controle WT e iNOS<sup>-/-</sup> (p<0,05; *two-way* ANOVA seguida pelo pós-teste de Bonferroni).

#### 4.11.3 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a expressão proteica de eNOS e nNOS

O tratamento crônico com etanol não alterou a expressão proteica das isoformas eNOS (Figura 15A) e nNOS (Figura 15B) em córtex renal de camundongos.

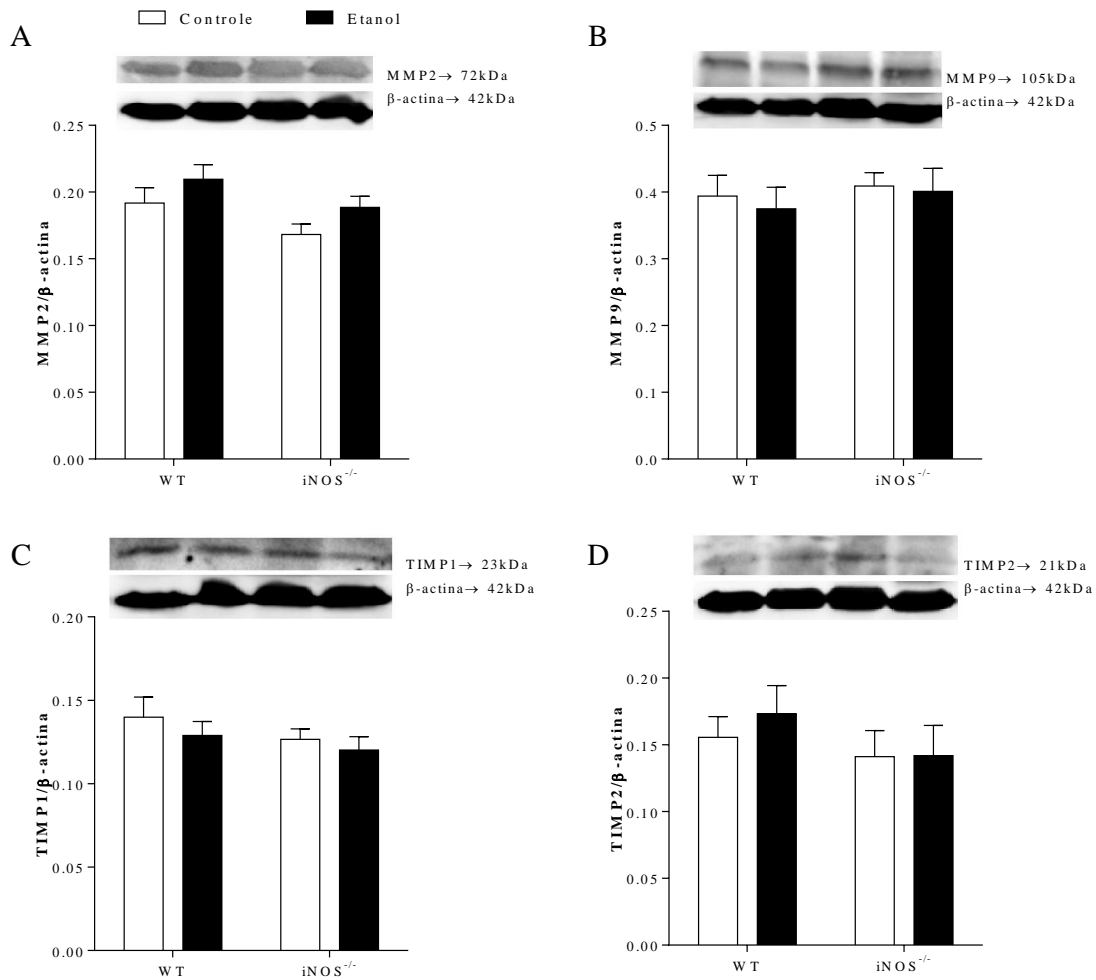


**Figura 15. Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a expressão proteica das enzimas eNOS e nNOS em córtex renal de camundongos WT e iNOS<sup>-/-</sup>.** *Painel superior:* imagens representativas da expressão das isoformas eNOS (A) e nNOS (B) obtidas por *Western Blotting*. *Painel inferior:* gráfico de barras demonstrando os valores expressos pela média ± EPM da densidade óptica relativa (n=4-7 por grupo). Os valores foram normalizados pelos correspondentes de β-actina (p>0,05; *two-way* ANOVA seguida pelo pós-teste de Bonferroni).

#### 4.11.4 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a expressão proteica de MMPs e TIMPs

A expressão proteica das gelatinases MMP2 (Figura 16A) e MMP9 (Figura 16B) e dos inibidores TIMP1 (Figura 16C) e TIMP2 (Figura 16D) não foi alterada nos camundongos que consumiram o etanol.

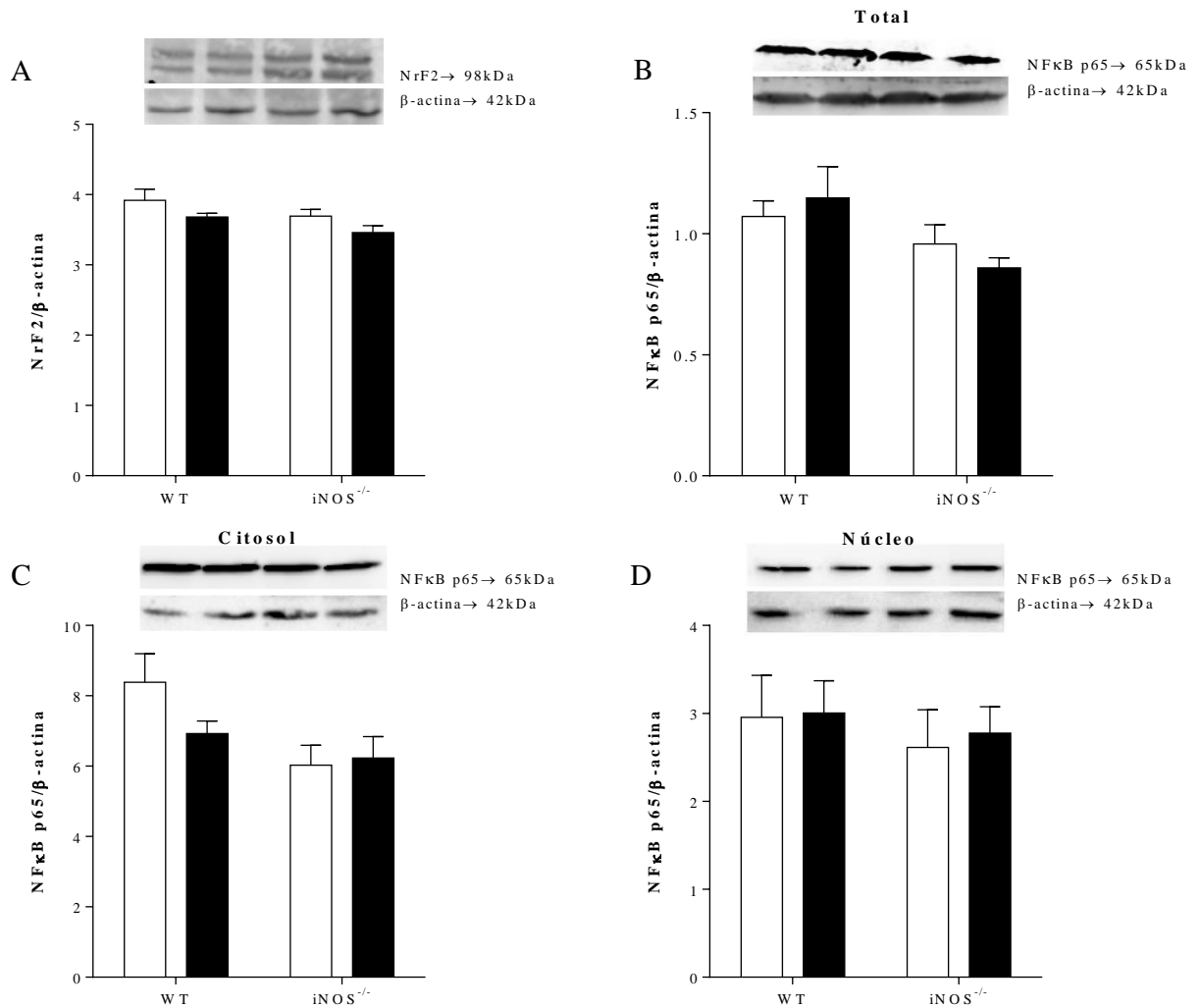




**Figura 16. Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a expressão proteica de MMP2, MMP9, TIMP1 e TIMP2 em córtex renal de camundongos WT e *iNOS*<sup>-/-</sup>.** Painel superior: imagens representativas da expressão de metaloproteinases [MMP2 (A) e MMP9 (B)] e de inibidores teciduais de metaloproteinases [TIMP1 (C) e TIMP2 (D)] por *Western Blotting*. Painel inferior: gráfico de barras demonstrando os valores expressos pela média  $\pm$  EPM da densidade óptica relativa (n=3-6 por grupo). Os valores foram normalizados pelos correspondentes de  $\beta$ -actina ( $p > 0,05$ ; *two-way* ANOVA seguida pelo pós-teste de Bonferroni).

#### 4.11.5 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a expressão proteica dos fatores de transcrição Nrf2 e NF- $\kappa$ B

O consumo crônico de etanol não modulou a expressão dos fatores de transcrição Nrf2 (Figura 17A) e NF- $\kappa$ B (Figuras 17B, C e D) no córtex renal dos camundongos.

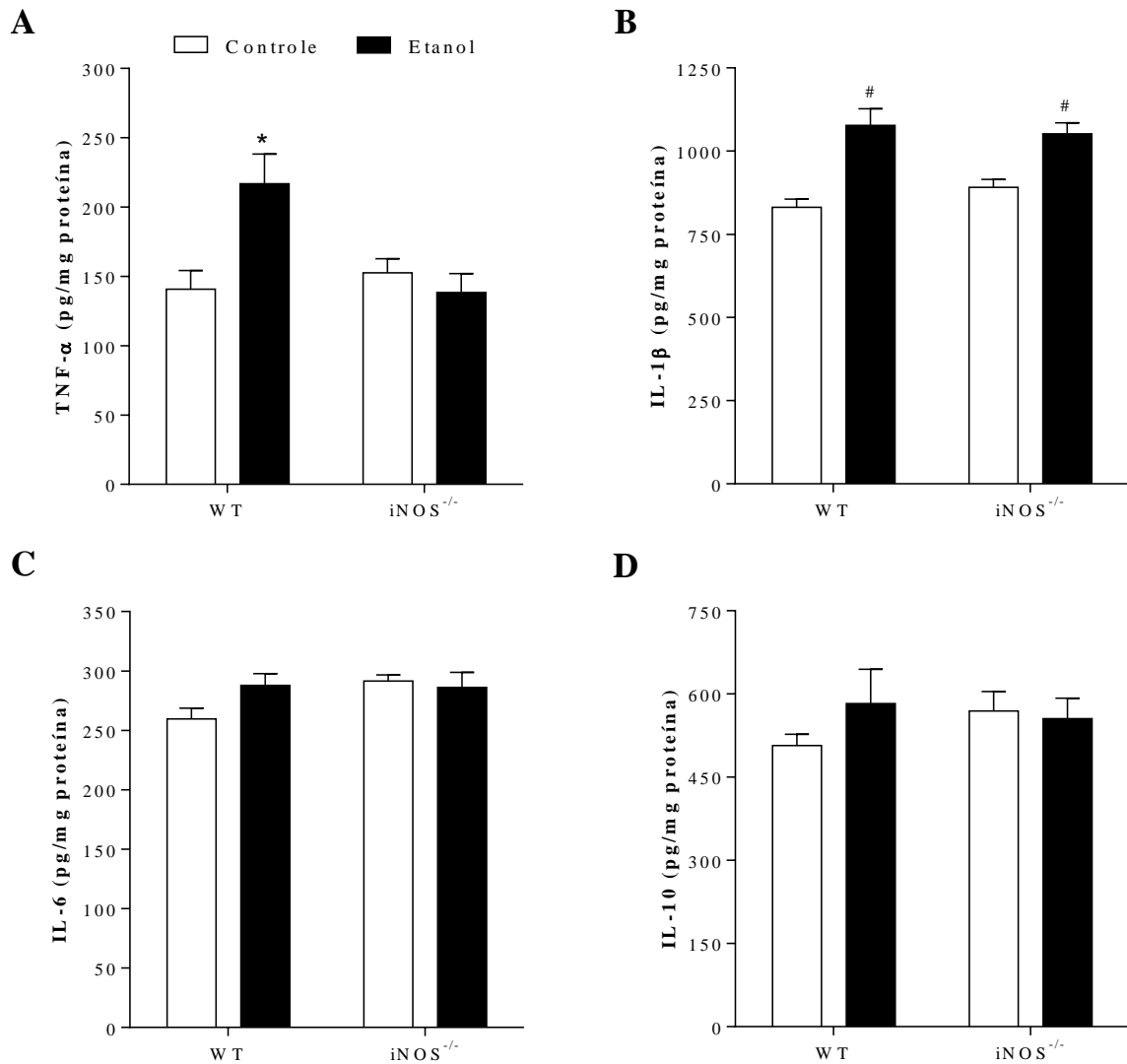


**Figura 17.** Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a expressão proteica dos fatores de transcrição Nrf2 e NF-κB em córtex renal de camundongos WT e iNOS<sup>-/-</sup>. *Painel superior:* imagens representativas da expressão de Nrf2 (A), da subunidade NF-κB p65 no homogenato total (B), fração citosólica (C) e fração nuclear (D) por *Western Blotting*. *Painel inferior:* gráfico de barras demonstrando os valores expressos pela média ± EPM da densidade óptica relativa (n=4-6 por grupo). Os valores foram normalizados pelos correspondentes de β-actina (p>0,05; *two-way* ANOVA seguida pelo pós-teste de Bonferroni).

#### 4.12 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre os níveis de TNF-α, IL-1β, IL-6 e IL-10 em córtex renal

O consumo crônico de etanol aumentou os níveis de TNF-α e IL-1β (Figuras 18A e B) no córtex renal de camundongos WT tratados. No entanto, em animais iNOS<sup>-/-</sup> foi observado

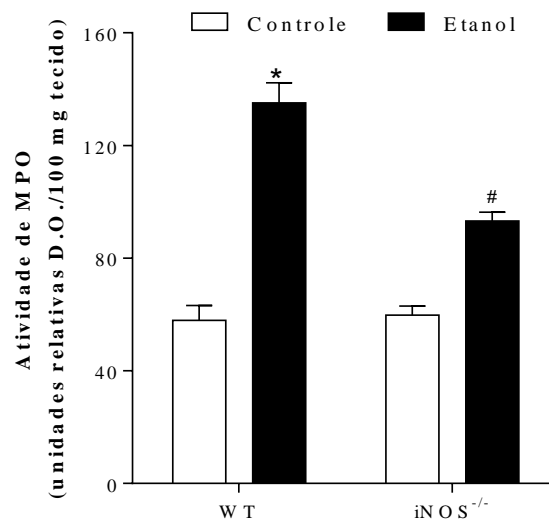
o aumento apenas de IL-1 $\beta$ . Não foram encontradas alterações nos níveis de IL-6 nem IL-10 após tratamento com etanol (Figuras 18C e D).



**Figura 18. Efeito do tratamento crônico com etanol sobre os níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10 em córtex renal de camundongos WT e iNOS<sup>-/-</sup>.** Os níveis teciduais de TNF- $\alpha$  (A), IL-1 $\beta$  (B), IL-6 (C) e IL-10 (D) foram avaliados por ELISA. O tratamento com etanol aumentou os níveis de TNF- $\alpha$  em córtex renal de animais WT, mas não em animais iNOS<sup>-/-</sup>. Houve aumento dos níveis de IL-1 $\beta$  em animais WT e iNOS<sup>-/-</sup>. Não foram encontradas alterações nos níveis de IL-6 e IL-10. Valores representam a média  $\pm$  E.P.M. (n=6 a 9 por grupo). \*Diferença significativa em relação aos demais grupos. #Diferença significativa em relação aos grupos controle WT e iNOS<sup>-/-</sup> (p<0,05; two-way ANOVA seguida pelo pós-teste de Bonferroni).

#### 4.13 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a atividade da MPO em córtex renal

O consumo crônico de etanol aumentou a atividade da MPO em córtex renal de animais WT. Este aumento foi menor em animais iNOS<sup>-/-</sup> (Figura 19).

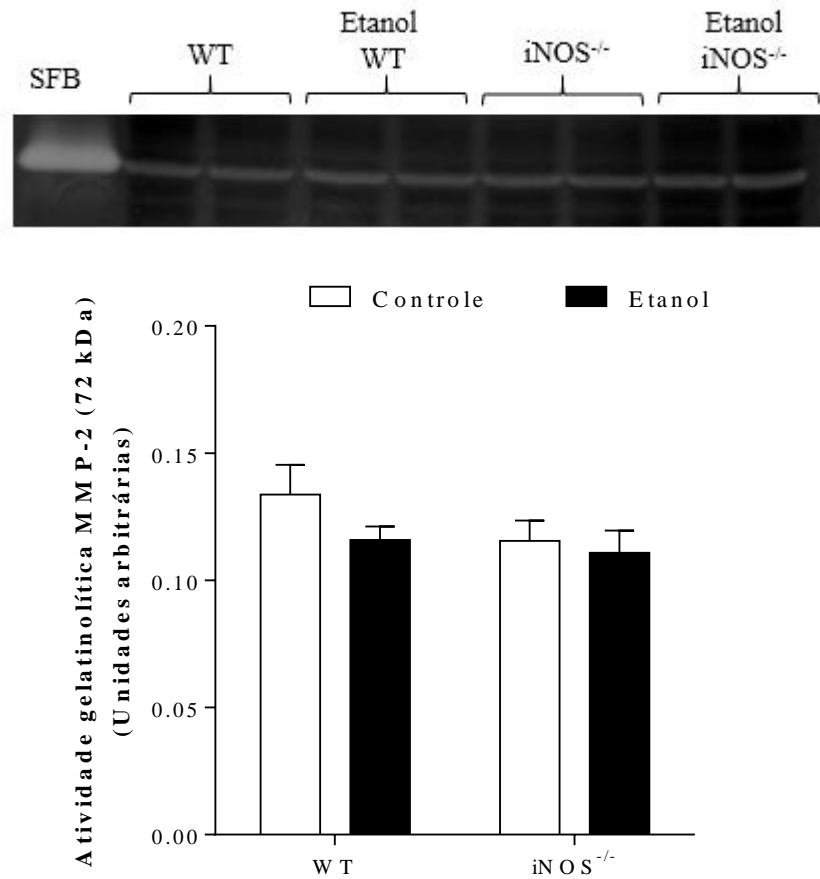


**Figura 19. Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a atividade da MPO em córtex renal de camundongos WT e iNOS<sup>-/-</sup>.** O tratamento com etanol aumentou a atividade de MPO em córtex renal de animais WT e iNOS<sup>-/-</sup>. Os valores representam a média  $\pm$  EPM (n=7-10 por grupo). \*Diferença significativa em relação aos demais grupos. #Diferença significativa em relação aos grupos controle WT e iNOS<sup>-/-</sup> ( $p < 0,05$ ; *two-way* ANOVA seguida pelo pós-teste de Bonferroni).

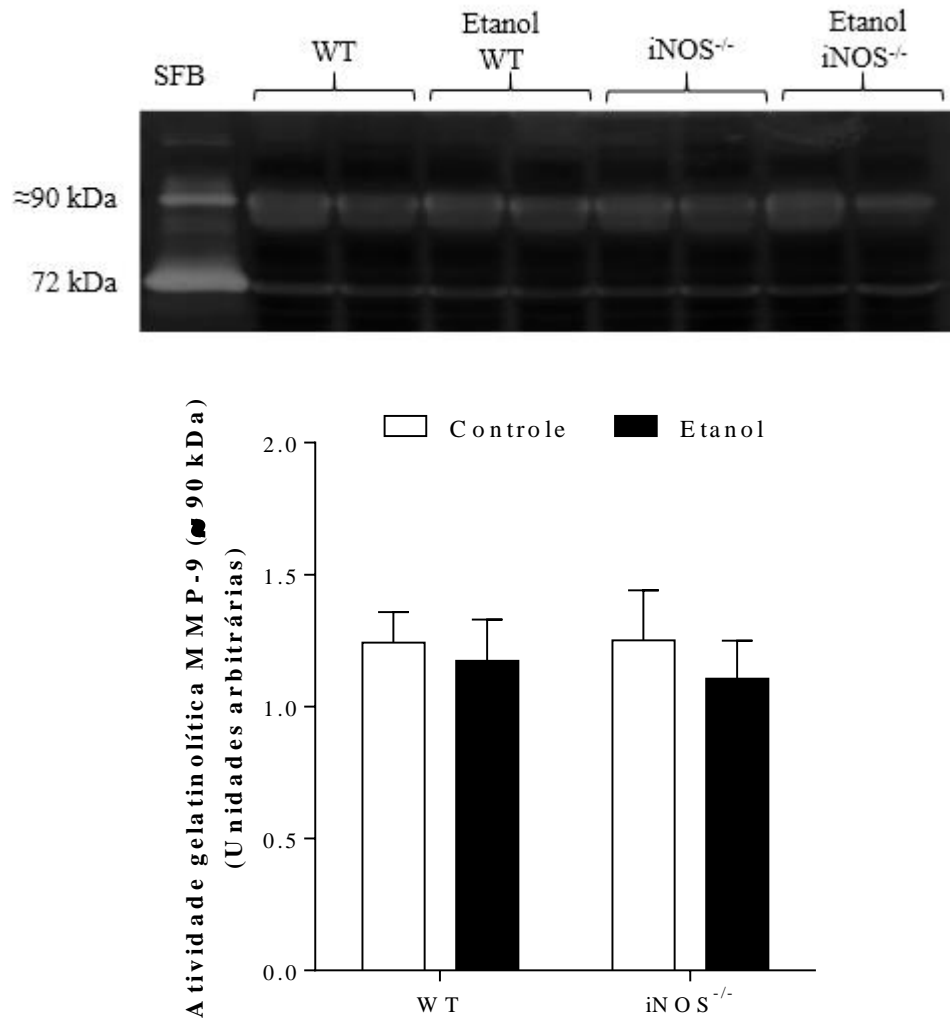
#### 4.14 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a atividade gelatinolítica *in situ* de MMPs

Zimogramas representativos dos extratos de córtex renal são apresentados nas Figuras 20 e 21, que mostram o peso molecular de uma banda de MMP-2 (72 kDa) (Figura 20) e duas bandas de MMP-9 (72 kDa e 90 kDa) (Figura 21). O tratamento crônico com etanol não alterou a atividade dessas gelatinases em córtex renal.

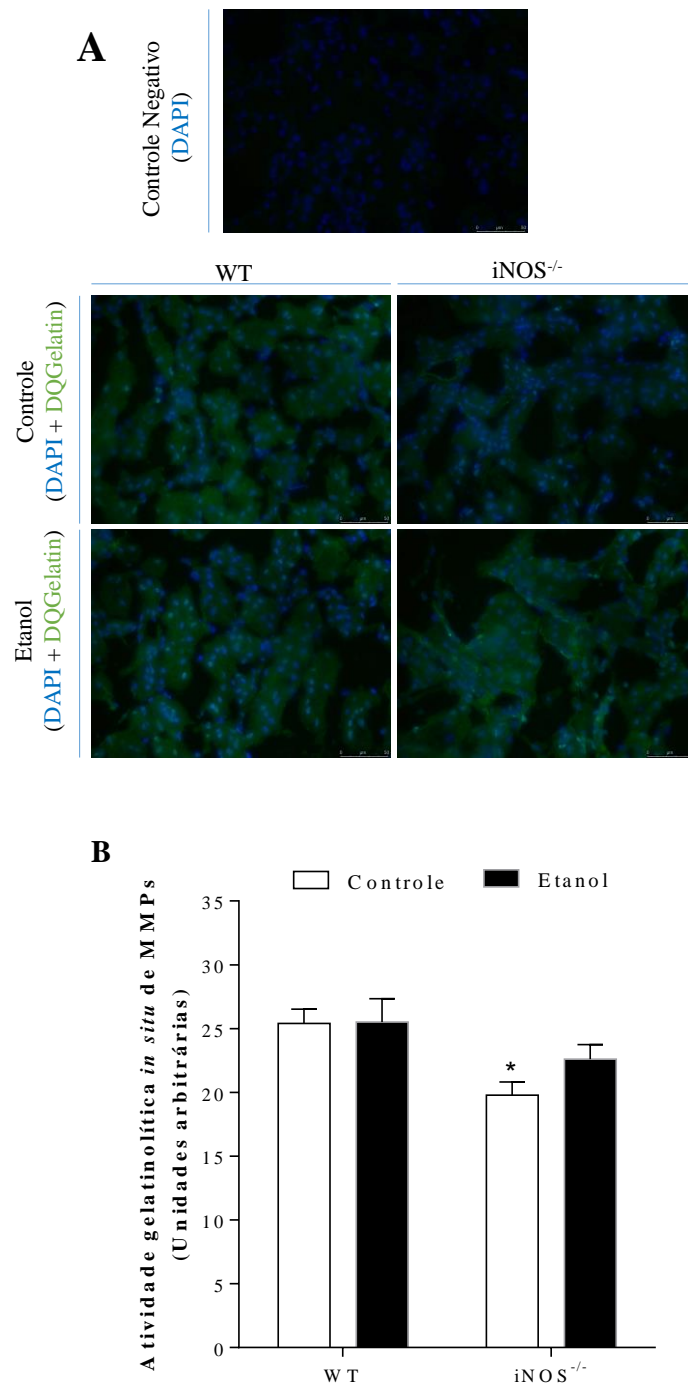
Também foi avaliada a atividade gelatinolítica das MMPs *in situ*. Essa atividade foi determinada pela análise da intensidade de fluorescência verde no córtex renal dos camundongos dos 4 grupos experimentais (Figura 22). A exposição crônica ao etanol não induziu alteração da atividade de MMPs em córtex renal, porém foi observada uma redução desta atividade nos animais iNOS<sup>-/-</sup> não tratados com etanol.



**Figura 20. Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a atividade gelatinolítica da MMP-2 em córtex renal de camundongos WT e iNOS<sup>-/-</sup>.** *Painel superior:* gel representativo de zimografia SDS-PAGE de extrato de córtex renal. O peso molecular das bandas de MMP-2 (72 kDa) foi identificado em gel a 8% SDS-PAGE. SFB: soro fetal bovino (padrão interno). *Painel inferior:* representação gráfica dos valores para peso molecular de 72 kDa da MMP-2 no extrato de córtex renal. Valores expressos como média  $\pm$  EPM (n=7-8 por grupo) ( $p > 0,05$ ; *two-way* ANOVA seguida pelo pós-teste de Bonferroni).



**Figura 21.** Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a atividade gelatinolítica da MMP-9 em córtex renal de camundongos WT e iNOS<sup>-/-</sup>. *Painel superior:* gel representativo de zimografia SDS-PAGE de extrato de córtex renal. Os pesos moleculares das bandas de MMP-9 (72 kDa e 90 kDa) foram identificados em gel a 8% SDS-PAGE. SFB: soro fetal bovino (padrão interno). *Painel inferior:* representação gráfica dos valores para peso molecular de 90 kDa da MMP-9 no extrato de córtex renal. Valores expressos como média ± EPM (n=5-6 por grupo) (p>0,05; *two-way* ANOVA seguida pelo pós-teste de Bonferroni).



**Figura 22.** Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a atividade gelatinolítica *in situ* de metaloproteinases de matriz (MMPs) em córtex renal de camundongos WT e iNOS<sup>-/-</sup>. (A) Fotografias representativas de córtex renal (x400) incubadas com DQ gelatina. (B) Representação gráfica da atividade gelatinolítica *in situ* de MMPs em córtex renal. Valores expressos como média ± EPM (n=4-5 por grupo). \*Diferença significativa em relação aos grupos controle e etanol WT (p<0,05; *two-way* ANOVA seguida pelo pós-teste de Bonferroni).

## 5 DISCUSSÃO

A importância clínica e experimental dos efeitos deletérios do etanol sobre o rim é atribuída à dose, duração da exposição, desnutrição, além da associação com outras doenças, como a doença hepática crônica (RODRIGO; RIVERA, 2002). A ingestão diária de uma dose para mulheres e duas doses para homens é considerada como consumo moderado (OMS, 2000), sendo que um consumo acima desses limites pode causar prejuízos ao indivíduo. Segundo Rodrigo e Rivera (2002), um consumo maior do que 24 gramas de etanol por dia está associado ao aumento do risco de falência renal. Porém, a associação entre a ingestão de etanol e a função renal ainda permanece pouco esclarecida. Sabe-se, no entanto, que a exposição ao etanol está associada à indução de desequilíbrios eletrolíticos, hiperuricemia (CHUNG et al., 2005; ADEWALE; IFUDU, 2014), além do aumento da formação de ERO e estresse oxidativo (RODRIGO; RIVERA, 2002; JALILI; ROSHANKHAH; SALAHSHOOR, 2019), que podem participar do processo fisiopatológico de doenças renais.

Em estudo de Jalili, Roshankhah e Salahshoor (2019), ratos expostos a uma dose diária de 5 g de etanol/ Kg peso corpóreo por 12 semanas, apresentaram alterações morfológicas em glomérulos renais, como o aumento do espaço de Bowman, retração glomerular e formação de tecido adiposo. Tirapelli et al. (2012) também observaram alterações histopatológicas em rins de ratos expostos ao etanol. Essas alterações foram associadas a um aumento da expressão de iNOS nos rins desses animais tratados por 6 semanas com solução de etanol 20% (vol./vol.) (TIRAPELLI et al., 2012). Estudos de Al-Harbi et al. (2017) mostraram que a inibição da iNOS diminuiu o estresse oxidativo e apresentou efeitos renoprotetores em modelo de estudo de inflamação. No presente trabalho, evidenciamos que o consumo crônico de etanol induziu o aumento da expressão da enzima iNOS em córtex renal de camundongos. Nossos dados corroboram estudos prévios do nosso grupo de pesquisa (TIRAPELLI et al., 2008; TIRAPELLI et al., 2012; LEITE et al., 2017; CERON et al., 2018), os quais também observaram uma relação positiva entre a exposição crônica ao etanol e a indução da enzima iNOS. Yuan et al. (2006) demonstraram que a indução da iNOS pelo etanol é tempo dependente, ou seja, quanto maior o tempo de exposição a essa substância, maiores são os níveis encontrados da enzima no organismo.

Em nosso estudo, as concentrações de etanol encontradas no sangue dos animais foram de, aproximadamente, 260 mg/dL, semelhante às concentrações observadas em outros modelos de animais para avaliação da toxicidade do etanol (SMATHERS et al., 2013; HARRIS et al.,



2015; SIMPLICIO et al., 2017), e dentro da faixa de níveis sanguíneos encontrados em humanos (URSO; GAVALER; VAN THIEL, 1981). Além disso, concentrações de etanol de, aproximadamente, 130 mg/dL estão associadas a alterações patológicas renais, como necrose tubular (TIRAPELLI et al., 2012). Portanto, a concentração encontrada é relevante e capaz de induzir estresse oxidativo renal (RODRIGO; RIVERA, 2002; HARRIS et al., 2015).

Durante o tratamento por 12 semanas, foi observada redução no consumo de ração e na ingestão líquida, acompanhadas de menor ganho de massa corporal nos camundongos WT e iNOS<sup>-/-</sup> que consumiram o etanol. Essas alterações também foram relatadas em estudos prévios (LARUE-ACHAGIOTIS; POUSSARD; LOUIS-SYLVESTRE, 1990; AGUIAR; DA-SILVA; BOAVENTURA, 2004; TIRAPELLI et al., 2008; TIRAPELLI et al., 2012), nos quais os animais também foram submetidos a tratamento crônico com solução de etanol como única fonte de líquido disponível, indicando que sua ingestão crônica está associada a mudanças no estado nutricional com consequente diminuição do ganho de peso.

Apesar do etanol ser uma substância desprovida de minerais, proteínas e vitaminas, sua oxidação pela enzima álcool desidrogenase (ADH), fornece energia ao organismo (7,1 Kcal por grama de etanol oxidado) (JORDÃO JÚNIOR et al., 1998; HECKMANN; SILVEIRA, 2009), sendo que essa energia consumida como álcool pode interferir em outras fontes de ingestão de energia (YEOMANS, 2004), ou seja, o seu consumo pode levar à redução na ingestão de ração. Além disso, o consumo crônico de etanol pode induzir um quadro de desnutrição devido à diminuição da ingestão de alimentos associada à desregulação na absorção e síntese de nutrientes (MOLINA et al., 2003; AGUIAR; DA-SILVA; BOAVENTURA, 2004). Larue-Achagiotis, Poussard e Louis-Sylvestre (1990) sugeriram que a desidratação e o gasto de energia aumentado em animais tratados cronicamente com etanol também são fatores que podem contribuir para o reduzido ganho de peso. Nesse sentido, essas alterações no estado nutricional induzidas pelo etanol podem diminuir o ganho de massa corporal durante o tratamento, corroborando os resultados encontrados.

Segundo Adewale e Ifudu (2014), o consumo de etanol pode atuar como um estímulo diurético ou antidiurético, dependendo do tempo de exposição. O tratamento crônico com etanol atua como um estímulo antidiurético, com maior retenção de água e eletrólitos devido a níveis sistêmicos elevados de vasopressina, também conhecida como hormônio antidiurético (RESSTEL et al., 2008; ADEWALE; IFUDU, 2014). Além de controlar a reabsorção de água nos túbulos renais, esse hormônio possui ação vasoconstritora, podendo aumentar a pressão

sanguínea ou manter a hipertensão induzida pelo etanol (RESSTEL et al., 2008; PASSAGLIA et al., 2015).

Resstel et al. (2008) sugeriram que um aumento na atividade de neurônios que produzem vasopressina pode ser devido à desidratação e osmolaridade plasmática aumentada, que são efeitos observados em animais tratados com etanol ou, ainda, por ação direta dessa substância. Porém, o efeito da ingestão crônica de etanol sobre os níveis de vasopressina é controverso. Dados do nosso grupo de pesquisa mostram que o tratamento crônico com etanol reduz os níveis de vasopressina em ratos (PASSAGLIA et al., 2015), sendo que essa redução também foi relatada em outros estudos da literatura (SILVA et al., 2004), incluindo modelos de exposição crônica em camundongos (GULYA; DAVE; HOFFMAN, 1991; GULYA et al., 1993). Sabe-se que o consumo de etanol pode induzir degeneração de neurônios hipotalâmicos responsáveis pela produção e secreção de vasopressina, podendo reduzir os níveis desse hormônio. Entretanto, uma atividade aumentada de neurônios magnocelulares, durante o consumo de etanol a longo prazo, parece ser um mecanismo compensatório frente a perda de neurônios. Já os neurônios parvocelulares reagem diminuindo a produção e expressão do hormônio (MADEIRA; PAULA-BARBOSA, 1999; SILVA; PAULA-BARBOSA; MADEIRA, 2002). Portanto, dependendo do efeito do etanol sobre esses neurônios, podemos observar a manutenção, diminuição ou aumento dos níveis circulantes de vasopressina.

Nossos resultados mostraram que os animais tratados com etanol apresentaram aumento da PAS a partir da sexta semana até o fim do tratamento. Esses dados corroboram estudos do nosso grupo de pesquisa, evidenciando a associação entre o consumo de etanol e a hipertensão (CERON et al., 2014; PASSAGLIA et al., 2015; MARCHI et al., 2016; SIMPLICIO et al., 2017; VALE et al., 2018). A hipertensão induzida pelo consumo de etanol está associada a diferentes mecanismos, incluindo a estimulação do sistema nervoso simpático (SNS), sistema renina angiotensina (SRA), disfunção endotelial e remodelamento vascular (CERON et al., 2014; PASSAGLIA et al., 2015; VALE et al., 2018).

O aumento da pressão arterial pode induzir lesões nos rins e, conseqüentemente, comprometer seu bom funcionamento, sendo um fator de risco para doenças renais (HEIDLAND et al., 1985). Além disso, a hipertensão é uma das principais causas de insuficiência renal crônica, sendo a sobrecarga salina e de volume, resultante da perda progressiva da capacidade renal de excretar íons  $\text{Na}^+$ , o aumento da atividade do SRA, a diminuição da produção de vasodilatadores e a disfunção endotelial, os principais mecanismos

envolvidos no desenvolvimento dessa doença em associação à hipertensão arterial (BORTOLOTTI, 2008).

Vale et al. (2018) relataram níveis circulantes elevados de adrenalina e noradrenalina em ratos tratados cronicamente com etanol, sugerindo o aumento da atividade simpática. Além disso, observaram aumento da pressão sanguínea em paralelo à indução do SRA, o qual foi caracterizado pelo aumento das concentrações plasmáticas da enzima renina, dos peptídeos angiotensina I e angiotensina II (Ang II) e da atividade da enzima conversora de angiotensina. Como essas respostas foram prevenidas em ratos tratados, concomitantemente, com um antagonista de receptor  $\beta_1$ -adrenérgico, os pesquisadores demonstraram a participação do SNS na ativação do SRA e, conseqüente, hipertensão induzida pelo etanol.

Passaglia et al. (2015) demonstraram que esse aumento da pressão é mediado por receptor  $AT_1$ , uma vez que ratos expostos ao etanol e tratados com losartan não apresentaram aumento da pressão arterial, apesar do aumento dos níveis circulantes dos componentes do SRA. Sabe-se que ativação do receptor  $AT_1$  pela Ang II, o principal peptídeo bioativo do SRA, induz aumento da atividade simpática, vasoconstrição, reabsorção renal de íons  $Na^+$  e secreção de aldosterona, culminando no desenvolvimento da hipertensão (TOUYZ; SCHIFFRIN, 2000; CAREY, 2013).

De acordo com Morishita et al. (2005), os quais avaliaram a PAS em camundongos C57BL/6J que apresentavam deficiência dos genes para eNOS, iNOS e/ou nNOS, a hipertensão é uma característica comum em animais que apresentam deficiência do gene eNOS, sendo este fenótipo relacionado à perda do NO dependente do endotélio, resultando em um aumento da resistência vascular periférica. No presente estudo, o aumento da PAS evidenciado em  $iNOS^{-/-}$ , que receberam o etanol, não foi observado em animais nocautes não tratados. Portanto, o aumento da pressão observado em camundongos  $iNOS^{-/-}$  não é uma alteração relacionada à deleção da enzima, mas ao tratamento com etanol.

Simplicio et al. (2017), os quais utilizaram o mesmo tempo de tratamento do presente estudo, mostraram que o consumo de etanol induziu aumento da PAS em camundongos WT e nocautes para o receptor R1 do fator de necrose tumoral alfa ( $TNFR1^{-/-}$ ), porém esse aumento foi menor nos animais  $TNFR1^{-/-}$ , sugerindo que essa alteração é parcialmente mediada pelo TNF- $\alpha$  após o consumo de etanol. Todavia, não evidenciamos diferenças na PAS entre os animais WT e  $iNOS^{-/-}$  tratados com etanol; portanto, a iNOS não está envolvida no aumento da PAS.

Variações normais nos valores de pressão entre 80 e 160 mmHg não se refletem em mudanças significativas na taxa de filtração glomerular e no fluxo sanguíneo renal, pois os rins apresentam mecanismos auto-regulatórios, incluindo o mecanismo miogênico, baseado na vasoconstrição em resposta ao estiramento na parede dos vasos, e o *feedback* tubuloglomerular, no qual ocorre constrição da arteríola aferente e redução na liberação de renina, resultando na manutenção do fluxo sanguíneo e da taxa de filtração glomerular dos rins mesmo com um aumento da pressão arterial (BALARINI, 2009). Portanto, sugerimos que as alterações observadas no córtex renal são induzidas pelo etanol, e não pelo aumento da PAS.

O consumo crônico de etanol induziu aumento da concentração sérica de creatinina nos camundongos WT e iNOS<sup>-/-</sup>, sem alterar, no entanto, os níveis séricos de ureia. A determinação de creatinina sérica é muito utilizada como um marcador da função renal (CHUNG et al., 2005; VOISIN et al., 2014), porém outros fatores além da taxa de filtração glomerular podem influenciar na sua concentração (CHUNG et al., 2005), como idade, gênero, massa muscular, metabolismo muscular, peso corporal, estado nutricional e de hidratação (URBSCHAT; OBERMÜLLER; HAFERKAMP, 2011; PERES et al., 2013). Os resultados encontrados corroboram estudo conduzido por Harris et al. (2015), no qual a toxicidade renal induzida por etanol foi avaliada por meio dos níveis de creatinina e pelo teste “blood urea nitrogen”, que se assemelha à dosagem de ureia sérica, sendo que o resultado obtido foi um aumento de creatinina sem alteração do nitrogênio ureico, indicando um estágio inicial de nefrotoxicidade mediada pelo etanol. Entretanto, concentrações séricas elevadas de creatinina e ureia foram observadas em ratos Wistar tratados com 1,6 g de etanol/kg peso corpóreo/dia por 12 semanas (DAS et al., 2008) ou com 5 g de etanol/kg peso corpóreo/dia por 8 semanas (SARAVANAN; NALINI, 2007).

Os níveis de ureia podem ser alterados de acordo com a alimentação do indivíduo, sendo que uma dieta rica em proteínas pode aumentar sua produção, enquanto que uma dieta com baixos níveis desse nutriente está relacionada à redução da sua concentração (PERES et al., 2013). Portanto, sugerimos que a discrepância entre os resultados observados nas concentrações séricas de creatinina e ureia, pode ser consequência da menor ingestão de proteínas pelos animais tratados com etanol, uma vez que eles apresentam menor consumo de ração.

A determinação dos níveis plasmáticos de íons Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup>, assim como da fração de excreção desses íons, também é utilizada como um parâmetro de avaliação da função renal (TIRAPELLI et al., 2012; VALE et al., 2017; FRANCESCATO et al., 2018). Por exemplo,

Francescato et al. (2018), utilizando modelo de injúria renal induzida por cisplatina, demonstraram associação de lesão do túbulo intersticial com aumento da fração de excreção dos íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ . Em nosso estudo, evidenciamos que o consumo crônico de etanol não alterou os níveis séricos dos íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , corroborando estudos do nosso grupo de pesquisa (TIRAPELLI et al., 2012; VALE et al., 2017). No entanto, esses dados não descartam a possibilidade de que exista alteração da excreção desses íons em nosso modelo.

Portanto, observamos que nem toda disfunção renal induzida pelo consumo crônico de etanol está associada a alterações em todos os parâmetros avaliados para determinar os efeitos sobre a função renal.

Estudos encontrados na literatura sugerem que o estresse oxidativo induzido pelo consumo de etanol pode ocasionar desordens estruturais e funcionais no tecido renal (SHANMUGAM et al., 2010; OZBEK, 2012; TIRAPELLI et al., 2012; ZHU et al., 2018; JALILI; ROSHANKHAH; SALAHSHOOR, 2019). Nossos dados mostraram que o consumo crônico de etanol induziu alterações funcionais e histopatológicas em córtex renal de camundongos. Alterações como o aumento do diâmetro glomerular e edema intersticial foram observadas em animais tratados com etanol. Contudo, não observamos efeito renoprotetor contra essas alterações em animais com deficiência para o gene iNOS. Porém, sabe-se que os efeitos deletérios relacionados à exposição ao etanol podem ocorrer devido à indução de diferentes vias e mecanismos. Além disso, os efeitos tóxicos de xenobióticos também podem ocorrer a níveis moleculares e/ou celulares. Portanto, torna-se pertinente o estudo dos efeitos da exposição ao etanol nos diferentes níveis.

Estudos do nosso grupo de pesquisa mostram que o tratamento crônico com etanol está relacionado ao aumento de estresse oxidativo, caracterizado pelo aumento da produção de espécies reativas e depleção do sistema antioxidante (SIMPLICIO et al., 2017; VALE et al., 2017; LEITE et al., 2017; CERON et al., 2018). Nesses trabalhos, a NADPH oxidase tem se mostrado a principal fonte geradora de ERO. Portanto, faz-se necessária a avaliação dos efeitos do etanol sobre a produção de ERO e a expressão das isoformas do complexo NADPH oxidase no rim.

No presente trabalho foram determinadas as concentrações de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  por meio dos ensaios de quimioluminescência da lucigenina e *Amplex® Red*, respectivamente. O método de quimioluminescência da lucigenina avalia a formação de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  via NAD(P)H oxidase, que é considerada a principal fonte de ERO. O tratamento com etanol induziu aumento da produção de  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , tanto nos animais WT quanto nos  $\text{iNOS}^{-/-}$ , sem alterar, no entanto, a concentração de

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Porém, ao compararmos as concentrações de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> encontradas nos animais tratados com etanol, os níveis produzidos nos animais iNOS<sup>-/-</sup> foram menores do que os níveis observados nos WT. Dessa maneira, sugerimos que o estresse oxidativo renal induzido pelo consumo de etanol pode ser mediado por alguma via de sinalização ativada pela enzima iNOS.

Para determinar as subunidades catalíticas da NADPH oxidase relacionadas a esse aumento de ERO observado, foram avaliados os padrões de expressão proteica de Nox1, Nox2 e Nox4 em córtex renal. O tratamento crônico com etanol aumentou a expressão de Nox4 em camundongos WT, o que não foi observado para Nox1 e Nox2. Nox4 é a isoforma predominante no rim (GORIN, 2013; OKAMURA; PENNATHUR, 2015). Seu papel protetor contra fibrose renal (KHODO et al., 2012) é considerado controverso, uma vez que um aumento da sua expressão já foi relatado em algumas doenças renais, como na nefropatia diabética (JHA et al., 2014; OKAMURA; PENNATHUR, 2015).

Em estudo de Watanabe et al. (2013), no qual foi avaliada a citotoxicidade renal induzida por p-cresil sulfato, danos em células tubulares humanas foram relacionados a uma elevada expressão de ácido ribonucléico mensageiro (mRNA) de Nox4 e p22phox, por meio de um aumento de ERO. Além disso, Block, Gorin e Abboud (2009), utilizando modelo experimental de diabetes, observaram que o silenciamento do gene para Nox4, cuja expressão estava aumentada em córtex renal, bloqueou a geração mitocondrial de O<sub>2</sub><sup>•-</sup>.

De acordo com Gorin (2013), alguns dos fatores que podem regular positivamente a expressão de Nox4 incluem a hiperglicemia, a insulina, o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I), o fator de crescimento transformador beta (TGF-β) e a Ang II. Além desses fatores, a IL-1 e o TNF-α também estão relacionados à ativação do complexo NADPH oxidase (GUADAGNIN et al., 2015). Como a expressão proteica de Nox4 não foi aumentada nos animais iNOS<sup>-/-</sup>, sugere-se a participação da iNOS na ativação de alguma via metabólica ou na indução de algum dos fatores citados anteriormente. Estudo do nosso grupo de pesquisa demonstrou que o aumento dos níveis teciduais de TNF-α, após consumo crônico de etanol, não foi observado em camundongos iNOS<sup>-/-</sup> (CERON et al., 2018); portanto, sugerimos que a indução de Nox4 pode estar relacionada ao aumento dos níveis dessa citocina mediado pela iNOS.

Sabe-se que um aumento da geração de ERN também pode ser observado após exposição crônica ao etanol (ARTEEL, 2003), por meio da ativação de vias relacionadas à indução da atividade ou expressão das enzimas NOS. Yuan et al. (2006) observaram que o consumo de etanol modula de forma diferente as isoformas da NOS, uma vez que o tratamento

crônico com etanol (dose diária de 8 gramas/ Kg de peso corpóreo) aumentou a atividade enzimática e os níveis de mRNA de iNOS, associado a um aumento da concentração de NO no tecido hepático, porém reduziu a atividade da eNOS sem alterar, no entanto, seus níveis de mRNA. Entretanto, estudos de Tirapelli et al. (2008) mostraram que o consumo crônico de etanol aumentou a expressão proteica aórtica de iNOS e diminuiu a eNOS, sem alterar os níveis de mRNA de ambas as isoformas. Nesse sentido, avaliamos o efeito do consumo crônico de etanol sobre a expressão proteica das isoformas da NOS e os níveis de NO em córtex renal dos animais tratados.

Nossos resultados mostraram que apesar do aumento da iNOS observado no córtex renal de camundongos que receberam etanol, o consumo crônico dessa substância não modulou a expressão proteica das isoformas eNOS ou nNOS, corroborando estudo de Ceron et al. (2018), no qual foi demonstrado que o tratamento crônico com solução de etanol 20% (vol./vol.) não alterou a expressão proteica das isoformas constitutivas da NOS, apesar de induzir a expressão de iNOS em leito arterial mesentérico, sugerindo que o estresse oxidativo induzido pela exposição ao etanol é mediado pela iNOS.

A concentração de NO em córtex renal foi avaliada utilizando o método de Griess, que determina de forma indireta a concentração deste composto nas amostras biológicas, através da mensuração tecidual de nitritos ( $\text{NO}_2$ ) e nitratos ( $\text{NO}_3$ ) –  $\text{NO}_x$  –, que são produtos mais estáveis do NO. Nossos resultados, mostraram que os níveis de  $\text{NO}_x$  em córtex renal dos camundongos tratados não foram alterados pelo etanol, porém as concentrações observadas nos animais iNOS<sup>-/-</sup> foram inferiores àquelas encontradas em animais WT. Esses achados corroboram estudo de Morishita et al. (2005), os quais observaram redução dos níveis de NO plasmático e urinário em camundongos iNOS<sup>-/-</sup>.

ERN, incluindo NO e ONOO<sup>-</sup>, são compostos altamente reativos, capazes de causar danos em macromoléculas, como proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA, além de danos em compostos contendo grupos sulfidril, por meio de reações de nitração, hidroxilação e peroxidação (ARTEEL, 2003; GOCHMAN; MAHAJNA; REZNICK, 2011; QIAN et al., 2013). Níveis elevados de nitrotirosina, um marcador da formação de ONOO<sup>-</sup>, foram associados ao aumento da mortalidade em pacientes com lesão renal aguda (QIAN et al., 2013). Thuraisingham et al. (2000) sugeriram o papel do ONOO<sup>-</sup> como importante mediador de danos túbulo-intersticial observados em pacientes com nefropatia diabética. Além disso, a prevenção da formação ou indução da degradação de ONOO<sup>-</sup> promove efeitos protetores contra danos morfológicos e renais (QIAN et al., 2013). Portanto, sugere-se que a ausência da enzima iNOS

atue como um fator protetor, uma vez que altas concentrações de NO e, por conseguinte, de ONOO<sup>-</sup>, podem causar efeitos prejudiciais em células e tecidos.

No presente estudo, houve aumento dos níveis de TBARS em córtex renal de animais WT tratados com etanol, indicando a presença de danos oxidativos nas estruturas das membranas celulares induzidos pelo etanol. Todavia, esse aumento de TBARS não foi observado em animais iNOS<sup>-/-</sup>. Esses achados corroboram dados encontrados por Husain et al. (2004), os quais observaram aumento dos níveis plasmáticos de malondialdeído – produto secundário do estresse oxidativo formado durante a lipoperoxidação –, após administração diária de solução de etanol 20% por até 12 semanas, sendo uma resposta tempo-dependente. Em outros trabalhos que também utilizaram modelo de exposição crônica ao etanol, os animais tratados apresentaram concentrações elevadas de TBARS em rim (DAS et al., 2008; VALE et al., 2017), assim como em outros tecidos – aorta torácica (PASSAGLIA et al., 2015; MARCHI et al., 2016; SIMPLICIO et al., 2017), leito arterial mesentérico (PASSAGLIA et al., 2015; CERON et al., 2018), coração (NAKASHIMA et al., 2019) – e plasma (PASSAGLIA et al., 2015; SIMPLICIO et al., 2017; CERON et al., 2018). Nossos resultados corroboram estudos de Ceron et al. (2018), os quais também não observaram aumento dos níveis de TBARS em animais iNOS<sup>-/-</sup> expostos cronicamente ao etanol.

A abundância de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa no rim, o torna um órgão altamente vulnerável aos danos oxidativos causados por espécies reativas (RODRIGO; RIVERA, 2002; DAS; VASUDEVAN, 2008). De acordo com Goligorsky, Brodsky e Noiri (2004), a formação excessiva de ONOO<sup>-</sup> está relacionada ao aumento de lipoperoxidação. Nossos resultados mostraram que as concentrações de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> e NO, os precursores de ONOO<sup>-</sup>, em iNOS<sup>-/-</sup> foram menores que aquelas observadas em animais WT tratados com etanol. Deste modo, sugerimos que camundongos nocautes apresentem menores níveis de ONOO<sup>-</sup> induzidos pelo etanol e, conseqüentemente, os níveis produzidos nesses animais não seriam suficientes para causar a oxidação de lipídeos em córtex renal dos camundongos nocautes.

O estresse oxidativo induzido pelo metabolismo do etanol não é resultado apenas de um aumento de ERO ou ERN, mas também ocorre devido a uma deficiência no sistema antioxidante (RODRIGO; RIVERA, 2002; OYENIHI et al., 2016), o qual pode ser classificado, baseado na sua ação sobre os radicais livres, em “*scavenger*” (formação de radical menos reativo) ou “*quencher*” (neutralização completa do radical). Além disso, os sistemas antioxidantes podem ser divididos em enzimático, incluindo as enzimas SOD, catalase, GPx e



glutationa redutase, e não enzimático, tais como a GSH, ácido ascórbico e vitamina E (POPOLO et al., 2013; GUADAGNIN et al., 2015).

Dentre os antioxidantes enzimáticos, pode-se destacar a SOD, que consiste num grupo de metaloenzimas responsáveis pela dismutação do  $O_2^{\cdot-}$  em  $H_2O_2$  e  $O_2$ , constituindo a primeira linha de defesa diante de um aumento de espécies reativas (ZELKO; MARIANI; FOLZ, 2002; GUADAGNIN et al., 2015), como o  $O_2^{\cdot-}$  e  $ONOO^-$  (FUKAI; USHIO-FUKAI, 2011). Em mamíferos, existem três isoformas da SOD, que se diferenciam pelo conteúdo metálico em seu sítio ativo, sendo elas a CuZn-SOD (SOD1) (citossólica), a Mn-SOD (SOD2) (mitocondrial) e a EC-SOD (SOD3) (extracelular), que também apresenta cobre e zinco em seu centro catalítico (ZELKO; MARIANI; FOLZ, 2002).

O  $H_2O_2$  formado pela ação da SOD, por sua vez, é convertido em água e  $O_2$  por ação das enzimas catalase e GPx (BRIONES; TOUYZ, 2010) que utiliza a GSH como substrato (SINDHU et al., 2005). Além do sequestro de  $H_2O_2$ , a catalase também tem por função a metabolização oxidativa do etanol (ZAKHARI, 2006; CERON et al., 2014). O tratamento crônico com etanol não alterou a atividade renal das enzimas SOD, catalase nem GPx. Esses resultados corroboram estudos do nosso grupo de pesquisa, os quais também não encontraram alteração da atividade dessas enzimas antioxidantes em animais tratados com etanol (MARCHI et al., 2016; SIMPLICIO et al., 2017; CERON et al., 2018; GONZAGA et al., 2018).

Por outro lado, os demais resultados relacionados ao sistema antioxidante renal mostram que o tratamento com etanol reduziu a expressão proteica de catalase e aumentou os níveis de GSH em córtex renal de camundongos WT e  $iNOS^{-/-}$ , sem alterar, no entanto, a concentração de GSSG. Vale et al. (2017) não observaram alteração da expressão tecidual de catalase nem dos níveis de GSH em rins de ratos Wistar tratados com etanol 20% (vol./vol.). Essa divergência de resultados pode ser devida a diferenças no tempo de tratamento e modelo animal utilizado.

Sindhu et al. (2005) observaram redução dos níveis proteicos e da atividade de catalase em rins de ratos machos Sprague-Dawley com insuficiência renal crônica. Portanto, podemos sugerir que essa redução no sistema antioxidante enzimático induzida pelo consumo crônico de etanol pode favorecer o desenvolvimento de doenças renais.

A GSH é um tripeptídeo (L- $\gamma$ -glutamil-L-cisteinil-glicina), cuja principal função é a manutenção do estado redox celular, por interação direta com ERO e ERN ou redução de peróxidos através da ação da GPx (FUJII et al., 2000). Além da atividade antioxidante, que é determinada pelo grupamento  $-SH$  (tiol) da cisteína, a GSH desempenha diferentes funções fisiológicas, como detoxificação de xenobióticos, armazenamento e transporte de cisteína,

modulação de transdução de sinal, regulação da proliferação celular, regulação da resposta imune e do metabolismo de leucotrienos e prostaglandinas (SANTANGELO et al., 2004).

O conteúdo de GSH no tecido renal pode ser regulado por influxo do espaço extracelular, via transporte pela membrana plasmática basolateral em células tubulares proximais, e síntese intracelular a partir de seus aminoácidos precursores (LASH, 2005). O aumento observado dos níveis renais de GSH em animais tratados com etanol pode estar relacionado a uma adaptação do organismo para compensar o aumento do estresse oxidativo renal, observado por um aumento da geração de espécies reativas ou pela diminuição do sistema antioxidante enzimático. No entanto, existem trabalhos na literatura mostrando uma redução da concentração de GSH associada ao consumo de etanol em diferentes tecidos, como coração (SINGH; AHLUWALIA, 2012), plasma (HUSAIN et al., 2004; SIMPLICIO et al., 2017) e rim (DAS et al., 2008; HARRIS et al., 2015), uma vez que a exposição crônica ao etanol induz a formação de peróxidos lipídicos, favorecendo a diminuição de GSH e sua oxidação a GSSG pela GPx (JORDÃO JÚNIOR et al., 1998). Segundo Jordão Júnior et al. (1998), essa relação entre o consumo de etanol e metabolismo da GSH não é bem estabelecida, podendo ser alterada pelo tempo de duração do tratamento bem como estado nutricional dos animais.

Uma vez encontradas alterações no sistema de defesa antioxidante, estudamos os efeitos do consumo crônico de etanol sobre o Nrf2, que é o principal fator de transcrição responsável pela regulação de genes relacionados a enzimas antioxidantes, como SOD, catalase e GPx (DI MEO et al., 2016; AMORIM et al., 2019). Sabe-se que ERO e ERN, em níveis fisiológicos, podem induzir fatores de transcrição de enzimas antioxidantes, contribuindo para o restabelecimento do equilíbrio redox. Entretanto, um aumento exacerbado dos níveis dessas espécies reativas modula negativamente esses fatores, bloqueando ou impedindo sua ação (AMORIM et al., 2019). Nossos dados mostram que a exposição crônica ao etanol não alterou a expressão proteica de Nrf2 em córtex renal de camundongos. Sugerimos, então, que essa falta de efeito do etanol sobre o Nrf2, esteja relacionada ao aumento de ERO e ERN observado no presente trabalho.

MMPs são enzimas capazes de sintetizar e degradar componentes proteicos da matriz extracelular (MEC). Alterações na expressão ou atividade de MMPs, como MMP-2 e MMP-9, podem induzir mudanças no turnover da MEC no glomérulo renal e essa resposta está associada à diminuição da função renal (LELONGT et al., 2001). Portanto, a regulação de MMPs torna-se importante na progressão ou reversão de doenças renais (RONCO; CHATZIANTONIOU, 2008). Alguns fatores que podem regular a ação de MMPs incluem citocinas, hormônios,

fatores de crescimentos e estresse oxidativo, que podem modular a expressão gênica, induzir a ativação da pró-forma latente (zimogênio) ou inibir seus inibidores teciduais, os TIMPs (DONNELLY; COLLINSON; MANNING, 2003; CENA; CHOW; SCHULZ, 2007).

Sillanaukee et al. (2002) relataram níveis séricos elevados de MMP-9 em etilistas crônicos. Além disso, os dados presentes na literatura apontam o consumo crônico de etanol como indutor da atividade de MMP-2 e/ou MMP-9 em aorta (PARTRIDGE; SAMPSON; FOROUGH, 1999), pulmão (LOIS et al., 1999), estômago (SWARNAKAR et al., 2007) e rim (TIRAPELLI et al., 2012) de roedores.

O efeito do consumo crônico de etanol sobre a regulação de MMPs foi avaliado pela determinação da expressão proteica das enzimas MMP-2 e MMP-9, e dos inibidores teciduais TIMP-1 e TIMP-2, e pela avaliação da atividade dessas MMPs pelas técnicas de zimografia em gel e *in situ*. Nossos resultados não demonstraram alterações nas expressões proteicas das MMPs e dos TIMPs, nem na atividade gelatinolítica de MMPs em córtex renal após tratamento com etanol, porém os animais iNOS<sup>-/-</sup> apresentaram uma atividade gelatinolítica *in situ* reduzida comparada aos demais grupos. Sabe-se que o ONOO<sup>-</sup> está relacionado à ativação de MMPs (OKAMOTO et al., 2001; RORK et al., 2006; SUNG et al., 2007). Em estudo de Tirapelli et al. (2012) foi observada uma atividade aumentada de MMP-2 associada ao aumento da expressão renal de iNOS induzida pelo etanol. Nesse sentido, essa diminuição da atividade de MMP observada nos camundongos iNOS<sup>-/-</sup> pode ser devida a uma menor formação de ONOO<sup>-</sup> nesses animais.

Lois et al. (1999) correlacionaram o aumento da atividade das gelatinases MMP-2 e MMP-9 com a depleção de níveis pulmonares de GSH em ratos que receberam etanol 20% (vol./vol.) por quatro semanas, pois observaram que em animais tratados, concomitantemente, com um precursor sintético de GSH – N-acetilcisteína –, a ativação das MMPs era inibida. Os autores propuseram que a glutatona pode prevenir ou limitar a ativação não proteolítica por fornecer grupos sulfidrila alternativos para oxidação por EROs. Com base nessas informações, sugerimos que o aumento dos níveis renais de GSH observado no presente estudo pode ter prevenido a ativação de MMPs em córtex renal dos camundongos WT e iNOS<sup>-/-</sup> tratados com etanol.

Além da avaliação dos efeitos do consumo crônico de etanol sobre a função renal, estresse oxidativo, sistema antioxidante e mediadores do remodelamento tecidual, determinamos a ação do etanol sobre a modulação da resposta inflamatória no rim, uma vez que a inflamação também pode contribuir para a progressão e desenvolvimento de doenças.

Szabo et al. (2011) propuseram que danos hepáticos induzidos pelo etanol estão relacionados à liberação de LPS, uma endotoxina de bactérias Gram negativas, e ativação de células de Kupffer, resultando na indução de citocinas inflamatórias, quimiocinas e ERO. O LPS é capaz de ativar a resposta imune pela ligação ao complexo TLR4. A estimulação desses receptores ativa a cascata de sinalização do NF- $\kappa$ B (SZABO et al., 2011), que leva a produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006). Essas citocinas podem modular a morte celular de tecidos inflamatórios, a permeabilidade endotelial vascular e o recrutamento de células sanguíneas (TAKEUCHI; AKIRA, 2010).

Mandrekar et al. (2009) mostraram o envolvimento de TLR4, via ativação de NF- $\kappa$ B, na produção de citocinas, particularmente de TNF- $\alpha$ , induzida pela exposição crônica ao etanol. Trabalhos publicados por nosso grupo de pesquisa, também demonstraram essa relação entre a administração por tempo prolongado de etanol e a indução de mediadores da inflamação (LEITE et al., 2017; SIMPLICIO et al., 2017; CERON et al. 2018). Além disso, níveis elevados de citocinas inflamatórias foram encontrados em pacientes etilistas (NEUPANE et al., 2014; ZAGO et al., 2016).

Para avaliar a associação do consumo de etanol e mediadores pró-inflamatórios no rim, foram determinados os níveis de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ ) e anti-inflamatória (IL-10), expressão proteica de NF- $\kappa$ B, além da atividade de MPO em córtex renal. Em nosso estudo foram observados níveis teciduais elevados das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , além do aumento da infiltração de neutrófilos, em animais tratados com o etanol, demonstrando a ativação de mediadores inflamatórios.

A indução renal de IL-1 $\beta$  não foi mediada pela iNOS, uma vez que o aumento da concentração tecidual dessa citocina foi observado tanto em animais WT quanto iNOS<sup>-/-</sup>. A IL-1 $\beta$  é uma potente citocina pró-inflamatória, cuja produção é regulada por um mecanismo de duas etapas. A primeira etapa envolve a expressão da forma latente da IL-1 $\beta$ , que é modulada pela síntese do mRNA via TLR, em resposta a um estímulo inflamatório. Já na segunda etapa, ocorre a maturação da IL-1 $\beta$  por meio da clivagem do zimogênio por caspase-1 (Casp-1) (TAKEUCHI; AKIRA, 2010; PETRASEK et al., 2012). Petrasek et al. (2012) observaram aumento dos níveis séricos e hepáticos de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 em camundongos fêmeas tratadas com etanol. Demonstraram ainda que a ingestão de álcool induziu aumento tanto dos níveis de mRNA de pró-IL-1 $\beta$  quanto da expressão proteica da sua forma ativa, em paralelo ao aumento da atividade de Casp-1, sugerindo que o etanol pode atuar nas duas etapas do mecanismo de regulação da produção dessa citocina.

Ceron et al. (2018) observaram expressão aumentada de iNOS em leito arterial mesentérico de camundongos tratados cronicamente com etanol. Ao comparar os efeitos do etanol sobre a produção de citocinas em camundongos WT e iNOS<sup>-/-</sup>, foram observados níveis teciduais elevados de IL-6 e TNF- $\alpha$ , sem alteração de IL-1 $\beta$ , em animais WT que receberam etanol 20% (vol./vol.) por 12 semanas. Esse aumento da formação de citocinas pró-inflamatórias não foi observado em iNOS<sup>-/-</sup>, demonstrando a participação da iNOS na produção de citocinas induzida pelo etanol, corroborando nossos resultados.

Leite et al. (2017) observaram aumento da expressão proteica de mediadores inflamatórios, como iNOS e molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1), bem como aumento dos níveis de TNF- $\alpha$  em músculo liso cavernoso de ratos expostos ao etanol. Em estudos de Iimuro et al. (1997), a administração de anticorpos para TNF- $\alpha$  atenuaram o processo inflamatório induzido por administração crônica de etanol em ratos. No presente trabalho, os camundongos iNOS<sup>-/-</sup> tratados com etanol não apresentaram o aumento dos níveis de TNF- $\alpha$ , observado em animais WT. Portanto, podemos sugerir um efeito renoprotetor na produção de mediadores da inflamação induzida pelo etanol.

Como mencionado anteriormente, a ativação de NF- $\kappa$ B pode levar à indução de mediadores inflamatórios, como iNOS e citocinas pró-inflamatórias. No presente estudo, investigamos a ativação de NF- $\kappa$ B pela avaliação da sua translocação para o núcleo das células. Apesar do aumento dos níveis da enzima iNOS e citocinas observado após consumo crônico de etanol, não evidenciamos a ativação do NF- $\kappa$ B em córtex renal de camundongos. Portanto, sugerimos que a indução de iNOS e/ou citocinas pelo etanol, não é mediada por ativação da via do NF- $\kappa$ B no córtex renal. No entanto, esses dados não descartam a possibilidade da ativação do NF- $\kappa$ B em outros tecidos e órgãos. Por outro lado, alguns estudos sugerem que outras vias de sinalização podem modular a iNOS, tais como modificações pós-translacionais ou RNA não-codificante (ncRNA) (CHANG et al., 2004; PAUTZ et al., 2010).

A migração de neutrófilos para o sítio da inflamação foi avaliada pela atividade de MPO em córtex renal. A MPO é uma enzima encontrada predominantemente nos grânulos azúrofilos dos neutrófilos, mas também pode estar presente em monócitos e alguns subtipos de macrófagos teciduais (HANSSON; OLSSON; NAUSEEF, 2006; NAUSEEF, 2018). Nossos resultados mostraram que o consumo crônico de etanol causou aumento da infiltração de neutrófilos, corroborando estudos da literatura (LATCHOUMYCANDANE; NAGY; MCINTYRE, 2014; LEITE et al., 2017; SIMPLICIO et al., 2017). Esse recrutamento de leucócitos para o local da inflamação envolve etapas de rolamento, ativação, adesão e transmigração dessas células da

corrente sanguínea para o tecido, as quais dependem da ativação e/ou expressão de receptores, conhecidos como moléculas de adesão (LEY et al., 2007). Mediadores da inflamação, tais como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, podem induzir a expressão de quimiocinas e moléculas de adesão como, por exemplo, as selectinas, integrinas e imunoglobulinas (ROMANO et al., 1997; QUINTAES, NORONHA, 1998).

Ramesh e Reeves (2002) relataram menor infiltração de leucócitos em rim de animais nocautes para TNF- $\alpha$ . Enquanto, Chatterjee et al. (2003) demonstraram a relação entre a inibição da iNOS e a atenuação da expressão renal de moléculas de adesão – P-selectina e ICAM-1 – com consequente redução da infiltração de células inflamatórias. Esses dados sugerem a participação tanto da enzima iNOS quanto de TNF- $\alpha$  na migração de neutrófilos para o tecido renal, o que corrobora os achados do nosso estudo. Portanto, esses dados indicam a participação da iNOS nos mecanismos da inflamação induzidos pelo consumo crônico de etanol no rim.

## 6 CONCLUSÕES

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

**REFERÊNCIAS<sup>2</sup>**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SILVA, T. P. et al. Effects of ethanol consumption on vasopressin and neuropeptide Y immunoreactivity and mRNA expression in peripheral and central areas related to cardiovascular regulation. **Alcohol**, v. 32, p. 213-222, 2004.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



## ANEXO I – Aprovação da CEUA



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**Campus de Ribeirão Preto**  
 Comissão de Ética no Uso de Animais

**CERTIFICADO ( 2<sup>a</sup> v i a )**

Certificamos que o projeto intitulado "Mecanismos da toxicidade renal induzida pelo consumo crônico de etanol: papel da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), protocolo nº 14.1.847.53.0, sob a responsabilidade de Carla Brigagão Pacheco da Silva e Carlos Renato Tirapelli que envolve a manutenção e/ou 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 ° 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Prefeitura de Campus de Ribeirão Preto (CEUA PUSP-RP) em reunião de 05/02/2015.

Vigência do Projeto	15/02/2015 a 15/02/2018
Espécie/Linhagem	Camundongo C57BL/6
Nº de animais	120
Idade/ Peso	50 - 80 dias / 20 - 25g
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central da PUSP-RP Centro de Criação de Camundongos Especiais da FMRP

Ribeirão Preto, 11 de fevereiro de 2016.

  
 Profa. Dra. Cláudia Maria Padovan  
 Presidente da CEUA PUSP-RP