



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



Os receptores AT₁ modulam a perda do efeito anti-contrátil do tecido adiposo perivascular induzida pelo etanol

WANESSA MAYUMI CARVALHO AWATA

Ribeirão Preto - SP

2023

WANESSA MAYUMI CARVALHO AWATA

Os receptores AT₁ modulam a perda do efeito anti-contrátil do tecido adiposo perivascular induzida pelo etanol

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Carlos Renato Tirapelli

“Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)”

Ribeirão Preto - SP

2023

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

FICHA CATALOGRÁFICA

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

AWATA, WANESSA MAYUMI CARVALHO

Os receptores AT₁ modulam a perda do efeito anti-contrátil do tecido adiposo perivascular induzida pelo etanol. Ribeirão Preto, 2023.

Tese de doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Carlos Renato Tirapelli

1. Etanol, 2. Tecido adiposo perivascular (PVAT), 3. Disfunção vascular, 4. Hipertensão, 5. Sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA).

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autora: Wanessa Mayumi Carvalho Awata

Título da Tese: Os receptores AT₁ modulam a perda do efeito anti-contrátil do tecido adiposo perivascular induzida pelo etanol

Orientador: Prof. Dr. Carlos Renato Tirapelli

Tese de Doutorado, apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de Concentração: Farmacologia.

A comissão julgadora do trabalho de defesa de tese de doutorado, em sessão pública realizada a ___/___/___, considerou o candidato:

() Aprovado

() Reprovado

Banca Examinadora

Examinador(a): Titular: Votante
Nome:
Instituição:
Assinatura:

Examinador(a): Titular: Votante
Nome:
Instituição:
Assinatura:

Examinador(a): Titular: Votante
Nome:
Instituição:
Assinatura:

Examinador: Presidente: Não votante
Nome:
Instituição:
Assinatura:

Dedicatória

*Dedico esta tese àqueles que estão
sempre ao meu lado, meus amados pais
Tânia e Frank e meu irmão Guilherme.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer as agências de fomento que me proporcionaram todo suporte financeiro para que esse trabalho fosse concluído e para que minha trajetória científica fosse trilhada.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) sob o processo número (2019/26467-9), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Códido de Financiamento 001.

Agradeço a todos os professores que cruzaram minha vida. Sou grata àqueles do Colégio Santa Ângela e do Curso G9 que foram essenciais para construir a base de todo meu conhecimento e me preparar para a universidade. Agradeço aos professores da Universidade Federal de Alfenas que moldaram todo o meu conhecimento como farmacêutica e que me apresentaram à ciência. Agradeço em especial ao professor Carlos Renato Tirapelli que me orientou por 6 anos durante o mestrado e doutorado. Sou muito grata por todo aprendizado que proporcionou meu crescimento. Obrigada por todo tempo disponibilizado e pela oportunidade, você foi fundamental por essa etapa concluída. Agradeço ao professor Thiago Bruder e Ariane que me receberam de braços abertos no laboratório em Pittsburgh nos Estados Unidos da América (EUA). Serei eternamente grata por todo apoio que recebi de vocês.

A ciência não é feita de um trabalho solo, mas sim com a ajuda de milhares de pessoas. Portanto, agradeço aos meus colegas de trabalho que não são apenas colegas, mas são meus amigos. Agradeço primeiramente ao Gabriel que esteve comigo desde quando entrei no mestrado, até hoje. Uma pessoa inigualável. À Natália que me ensinou todos os experimentos. À Carla que sempre esteve disponível para tirar minhas dúvidas. Ao Victor que está comigo desde o início e sempre foi o mais solícito e me deu apoio em tudo que precisei. Ao Gustavo que é uma das pessoas mais incríveis que conheci e sempre tirou um sorriso meu, tornando meus dias mais leves. Agradeço por todos os seus conselhos que levarei para vida. Ao Thales que foi se aproximando de mim devagarinho e se tornou um grande amigo, agradeço por sempre estar disponível em ajudar e a ouvir. Ao Ívis que é uma das pessoas mais puras que já conheci e sou muita grata por uma pessoa como essa ter feito parte da minha caminhada. Ao Arthur que é gigante e me acompanhou nos meus dias de luta, sempre me ajudando e me fazendo sorrir. À Marcela que foi colaboradora desse projeto. Por fim, a todos os alunos de

iniciação científica que passaram no laboratório, os quais foram essenciais para meu crescimento.

Agradeço aos meus amigos que sempre me apoiaram emocionalmente com risadas e trocas muito enriquecedoras no dia a dia. Sou grata à Aline que sem dúvidas fez parte de cada detalhe da minha trajetória, sempre esteve presente seja pra comemorar minhas vitórias ou para enxugar minhas lágrimas nos dias difíceis. Ao Juliano e Rafael que compartilharam comigo cada nova experiência durante o ano que vivemos nos EUA. Ao Bill que chegou, acompanhou meus sacrifícios no trabalho e sempre me mostrou que a vida é muito mais do que isso. Mostrou que a essência, os momentos e a simplicidade são muito mais valiosos do que o salário no final do mês. À Marcela e Luana que me acompanham desde a faculdade, as quais sempre foram meu porto seguro em termo de amizade e com quem contar na vida. Por fim, sou grata aos amigos Flávio, Shangle, Bruna e Camila que também sempre me acompanharam de perto.

E aqui deixo meus agradecimentos para as pessoas mais importantes da minha vida, minha família. Em especial, agradeço aos meus pais Tânia e Frank que nunca mediram esforços pra me apoiarem. Vocês são minha motivação de luta e do acordar todos os dias, porque um dia irei retribuir tudo que vocês me ofereceram. Obrigada por todo carinho, amor, zelo e paciência. Vocês são perfeitos.

“Na vida, não existe nada a temer, mas a entender.”

(Marie Curie)

Resumo

AWATA, W.M.C. **Os receptores AT₁ modulam a perda do efeito anti-contrátil do tecido adiposo perivascular induzida pelo etanol.** 2023. 110 p. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

O tecido adiposo perivascular (*perivascular adipose tissue* - PVAT) apresenta implicações na fisiopatologia das doenças cardiovasculares e o sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA) desempenha importante papel no mecanismo dessas doenças, uma vez que o PVAT expressa os receptores AT₁, os quais o peptídeo angiotensina II (ANG II) exerce suas ações. Além disso, diversos estudos sugerem que o SRAA participa do aumento da pressão arterial e da disfunção vascular induzida pelo consumo de etanol. Já foi demonstrado que o consumo de etanol aumenta os níveis circulantes de ANG II. Portanto, no presente estudo testamos a hipótese de que o etanol via receptor AT₁, irá alterar a produção/ação de fatores vasorelaxantes derivados do PVAT, além de estimular o recrutamento de células inflamatórias que juntos, promoverão prejuízo no efeito anti-contrátil do PVAT por mecanismos associados ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e diminuição da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO). Para tanto, ratos Wistar Hannover (260-280g) foram distribuídos nos grupos: 1) Controle; 2) Etanol: etanol a 20% (vol./vol/) 3) Losartan: losartan (antagonista dos receptores AT₁ - 10mg/kg/dia, gavagem) 4) Etanol-losartan: etanol a 20% (vol./vol.) e losartan (10mg/kg/dia). Para a avaliação funcional (3^a e 9^a semanas de tratamento), aortas torácicas com ou sem PVAT e com ou sem endotélio foram coletadas. Para os demais experimentos (3^a semana de tratamento), PVAT periaórtico e aorta torácica foram coletados. O consumo de etanol reduziu a ingestão de alimento e líquido dos animais. Observamos aumento da pressão arterial sistólica, diastólica e média na 9^a semana de tratamento, sem nenhuma alteração na 3^a semana. Demonstramos perda do efeito anti-contrátil do PVAT periaórtico em resposta ao consumo de etanol de maneira dependente do endotélio no período de pré-hipertensão (3^a semana de tratamento) e durante a hipertensão (9^a semana de tratamento). O tratamento com o losartan preveniu o aumento da pressão arterial e a perda do efeito anti-contrátil do PVAT, sugerindo a participação do receptor AT₁ nessas respostas. Com o intuito de investigar os mecanismos envolvidos nos resultados observados, avaliamos os fatores vasorelaxantes derivados do PVAT com efeitos dependentes do endotélio. A adiponectina apresentou-se reduzida no PVAT periaórtico de animais tratados com etanol e o losartan preveniu esse efeito. Ensaio funcionais demonstraram que a incubação do A779 (antagonista do receptor MAS) não alterou a contração de anéis aórticos na presença do PVAT e do endotélio de animais do grupo etanol, sugerindo que o etanol prejudicou o efeito anti-contrátil da angiotensina (1-7). Entretanto, o A779 aumentou a contração dos anéis aórticos dos animais do grupo etanol-losartan. A leptina e a PGI₂ não foram alteradas entre os grupos. Além desses achados, a incubação com o L-NAME (inibidor não seletivo das NOS) sugeriu que o consumo de etanol afetou a biodisponibilidade endotelial de NO e a incubação com o tiron (sequestrador de O₂^{•-}) reverteu a perda do anti-contrátil do PVAT induzida pelo

etanol em anéis aórticos apenas na presença do endotélio, sugerindo aumento de O_2^- endotelial. Por fim, não observamos uma resposta inflamatória no PVAT induzida pelo etanol. Nossas descobertas demonstraram que os receptores AT_1 estão implicados na disfunção do PVAT induzido pelo etanol. Esta resposta ocorre de maneira dependente do endotélio e é mediada pela diminuição da produção/ação da adiponectina e angiotensina (1-7) respectivamente. Finalmente, sugerimos que a disfunção do PVAT contribui para o aparecimento e manutenção do estado hipertensivo induzido pelo etanol.

Palavras-chave: Etanol, Tecido adiposo perivascular (PVAT), Disfunção vascular, Hipertensão, Sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA).

Abstract

AWATA, W.M.C. **AT₁ receptors modulate ethanol-induced loss of anticontractile effect of perivascular adipose tissue.** 2023. 110 p. Thesis (Ph.D. in Pharmacology) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

Perivascular adipose tissue (PVAT) has implications in the pathophysiology of cardiovascular diseases and renin angiotensin aldosterone system (RAAS) plays an important role in the mechanism of these diseases, since PVAT expresses AT₁ receptors, which angiotensin II (ANG II) performs its actions. Furthermore, several studies suggest that RAAS participates in the increase of blood pressure and vascular dysfunction induced by ethanol consumption. It has been shown that ethanol consumption increases circulating levels of ANG II. Therefore, in the present study we have tested the hypothesis that ethanol via AT₁ receptor will alter the production/action of vasorelaxant factors derived from PVAT while also stimulating the recruitment of inflammatory cells that may promote impairment in the anti-contractile effect of PVAT through mechanisms associated with increased production of reactive oxygen species (ROS) and decreased bioavailability of nitric oxide (NO). With this purpose, Wistar Hannover rats (260-280g) were distributed into the following groups: 1) Control; 2) Ethanol: 20% ethanol (vol./vol/) 3) Losartan: losartan (AT₁ receptor antagonist - 10mg/kg/day, gavage) 4) Ethanol-losartan: 20% ethanol (vol./vol.) and losartan (10mg/kg/day). For functional assessment (3rd and 9th weeks of treatment), thoracic aortas with or without PVAT and with or without endothelium were collected. For the remaining experiments (3rd week of treatment), thoracic aorta and PVAT were collected. Ethanol consumption reduced the animals' food and liquid intake. We observed an increase in systolic, diastolic and mean blood pressure in the 9th week of treatment, with no change in the 3rd week. We observed loss of the anti-contractile effect of periaortic PVAT in response to ethanol consumption in an endothelium-dependent manner in pre-hypertension period (3rd week of treatment) and during hypertension (9th week of treatment). Treatment with losartan prevented the increase in blood pressure and the loss of the anti-contractile effect of PVAT, suggesting the participation of AT₁ receptor in these responses. In order to investigate the mechanisms involved in the observed results, we evaluated vasorelaxant factors derived from PVAT with endothelium-dependent effects. Adiponectin was reduced in PVAT by ethanol and losartan prevented this effect. Functional assays demonstrated that incubation of A779 (*Mas* receptor antagonist) did not alter the contraction of aortic rings in the presence of PVAT and endothelium of animals from the ethanol group, suggesting that ethanol impaired the anti-contractile effect of angiotensin (1-7). However, A779 increased the contraction of aortic rings from animals in the ethanol-losartan group. Leptin and PGI₂ were not changed among the groups. In addition to these findings, incubation with L-NAME (non-selective NOS inhibitor) suggested that ethanol consumption affected endothelial NO bioavailability and incubation with tiron (O₂^{•-} scavenger) reversed the loss of anti-contractile of PVAT induced by ethanol in aortic rings only in the presence of endothelium, suggesting increased endothelial O₂^{•-}. Finally, we did not observe any inflammatory response in PVAT induced by ethanol. Our findings demonstrated that AT₁ receptors are implicated in ethanol-induced PVAT dysfunction. This response

occurs in an endothelium-dependent manner and is mediated by the decrease in the production/action of adiponectin and angiotensin (1-7) respectively. Finally, we suggest that PVAT dysfunction contributes to the onset and maintenance of the ethanol-induced hypertensive state.

Keywords: Ethanol, Perivascular adipose tissue (PVAT), Vascular dysfunction, Hypertension, Renin angiotensin aldosterone system (RAAS).

Lista de figuras

Figura 1. Diferença regional e morfológica de PVAT	26
Figura 2. Alguns dos principais mediadores (em azul), enzimas (em vermelho) e receptores (em roxo) presentes nas células endoteliais (EC) e no tecido adiposo perivascular (PVAT) que influenciam as células musculares lisas (SMC)	28
Figura 3. Modelo de tratamento com etanol.....	38
Figura 4. O consumo de etanol reduz a ingestão de líquido e ração em ratos.....	53
Figura 5. Ativação de receptores AT ₁ modula a hipertensão arterial induzida pelo consumo de etanol	55
Figura 6. O consumo de etanol promove disfunção do PVAT periaórtico e compromete a função vascular após 3 semanas de tratamento	57
Figura 7. O consumo de etanol promove disfunção do PVAT periaórtico e compromete a função vascular após 9 semanas de tratamento	60
Figura 8. Ativação de receptores AT ₁ participa da perda do efeito anti-contrátil do PVAT periaórtico de ratos tratados com etanol.....	62
Figura 9. Ativação de receptores AT ₁ prejudica a função da angiotensina (1-7) do PVAT periaórtico de ratos tratados com etanol.....	65
Figura 10. A ativação de receptores AT ₁ reduz concentração de adiponectina de PVAT periaórtico de ratos tratados com etanol, mas não altera a concentração de leptina	67
Figura 11. O consumo de etanol não altera a ação modulatória vascular e a concentração indireta do PGI ₂ no PVAT periaórtico.....	69
Figura 12. O consumo de etanol não altera a concentração de NO no PVAT periaórtico e na túnica média	71
Figura 13. O consumo de etanol prejudica a via nitrérgica de maneira dependente do endotélio	73

Figura 14. O consumo de etanol não altera a concentração de $O_2^{\cdot-}$ no PVAT e na túnica média e a atividade da SOD	76
Figura 15. $O_2^{\cdot-}$ participa da perda do efeito anti-contrátil do PVAT de maneira dependente do endotélio induzida pelo consumo de etanol	78
Figura 16. O consumo de etanol não altera a concentração de H_2O_2 , atividade da catalase e do GPx no PVAT periaórtico	81
Figura 17. O consumo de etanol não altera os mediadores pró-inflamatórios no PVAT periaórtico	83
Figura 18. Consumo de etanol não promove infiltração de macrófagos no PVAT periaórtico	85
Figura 19. Esquema representativo da conclusão do estudo	101

Lista de tabelas

Tabela 1. Valores de E_{max} (mN) e pD_2 de fenilefrina e serotonina em aorta PVAT(+) e PVAT(-), Endo(+) ou Endo(-) referentes à 3ª semana de tratamento com etanol.....	58
Tabela 2. Valores de E_{max} (mN) e pD_2 de fenilefrina em aorta PVAT(+) e PVAT(-), Endo(+) ou Endo(-) referentes à 9ª semana de tratamento com etanol.	60
Tabela 3. Valores de E_{max} (mN) e pD_2 de fenilefrina e serotonina em aorta PVAT (+), PVAT (-) e Endo(+) referentes ao tratamento de losartan ao término da 3ª semana de tratamento.	63
Tabela 4. Valores de E_{max} (mN) e pD_2 de fenilefrina em aortas PVAT(+)/Endo(+), PVAT(+)/Endo(-) e PVAT(-)/Endo(+) na presença do A779 ao término da 3ª semana de tratamento	66
Tabela 5. Valores de E_{max} (mN) e pD_2 de fenilefrina em aortas PVAT(+)/Endo(+), PVAT(+)/Endo(-) na presença do RO1138452 ao término da 3ª semana de tratamento	70
Tabela 6. Valores de E_{max} (mN) e pD_2 de fenilefrina em aortas PVAT(+)/Endo(+), PVAT(-)/Endo(+) e PVAT(+)/Endo(-) na presença do L-NAME ao término da 3ª semana de tratamento.	74
Tabela 7. Valores de E_{max} (mN) e pD_2 de fenilefrina em aortas PVAT(+)/Endo(+), PVAT(-)/Endo(+), PVAT(+)/Endo(-) e PVAT(-)/Endo(-) na presença do tiron ao término da 3ª semana de tratamento	79

Sumário

1	INTRODUÇÃO	21
1.1.	Consumo de etanol e doenças cardiovasculares.....	21
1.2.	Consumo de etanol e a ativação do SRAA	22
1.3.	O tecido adiposo perivascular e a modulação do tônus vascular	25
1.4.	Disfunção do tecido adiposo perivascular e doenças cardiovasculares	27
1.5.	O tecido adiposo perivascular e o consumo de etanol	30
2	JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE.....	32
3	OBJETIVOS	34
3.1	Objetivo Geral	34
3.2	Objetivos específicos.....	34
4	MÉTODOS	36
4.1.	Animais	36
4.2.	Grupos experimentais.....	36
4.3.	Evolução temporal do consumo de líquido e ração pelos animais.....	38
4.4.	Medida da pressão arterial.....	38
4.5.	Estudo funcional da reatividade vascular em aortas PVAT(+) e PVAT(-).....	39
4.6.	Avaliação das concentrações dos fatores relaxantes derivados do PVAT	40
4.6.1.	Determinação da concentração de adiponectina	40
4.6.2.	Determinação da concentração de leptina.....	41
4.6.3.	Determinação dos níveis de NO	42
4.6.3.1.	Determinação da concentração de nitrato/nitrito (NOx)	42
4.6.3.2.	Visualização de NO in situ	42
4.6.4.	Determinação da concentração de 6-keto-PGF1 α	43

4.7. Avaliação do estresse oxidativo no PVAT: determinação da geração de ERO	43
4.7.1. Determinação da concentração de $O_2^{\bullet -}$	43
4.7.2. Visualização de ERO in situ	44
4.7.3. Determinação da concentração de H_2O_2	44
4.8. Avaliação da capacidade antioxidante no PVAT:.....	45
4.8.1. Determinação da atividade do superóxido dismutase (SOD)	45
4.8.2. Determinação da atividade da catalase	45
4.8.3. Determinação da atividade da glutathiona peroxidase (GPx).....	46
4.9. Avaliação do perfil inflamatório no PVAT.....	47
4.9.1. Determinação da concentração de MCP-1	47
4.9.2. Determinação da concentração de RANTES	47
4.9.3. Determinação da atividade da n-acetilglicosaminidase (NAG)	48
4.9.4. Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO).....	48
4.9.5. Determinação da concentração de $TNF-\alpha$	49
4.9.6. Análise de citometria de fluxo	50
4.10. Análise estatística.....	50
4. RESULTADOS.....	53
5.1. Efeito do consumo de etanol sobre a evolução temporal da ingestão de líquido e ração e avaliação do receptor AT_1 nessa resposta.....	53
5.2. Efeito do consumo de etanol sobre a pressão arterial sistólica, diastólica, média e frequência cardíaca e avaliação da participação do receptor AT_1 nessa resposta	53
5.3. Estudo funcional de reatividade vascular em aortas torácicas	56

5.3.1. Efeito do consumo de etanol sobre a resposta contrátil à fenilefrina e serotonina ao término da 3ª semana de tratamento.....	56
5.3.2. Efeito do consumo de etanol sobre a resposta contrátil à fenilefrina ao término da 9ª semana de tratamento.	59
5.3.3. Avaliação da participação do receptor AT ₁ no efeito do consumo de etanol sobre a resposta anti-contrátil do PVAT	61
5.4. Avaliação dos mecanismos pelos quais o etanol via receptor AT ₁ promove disfunção do PVAT	63
5.4.1. Efeito do consumo de etanol sobre os fatores relaxantes dependentes do endotélio derivados do PVAT	63
5.4.1.1. Efeito do consumo de etanol sobre a ação modulatória vascular da Ang (1-7) e avaliação da participação do receptor AT ₁ nessa resposta.....	63
5.4.1.2. Efeito do consumo de etanol sobre as concentrações da adiponectina e leptina e avaliação da participação do receptor AT ₁ nessa resposta.....	67
5.4.1.4. Efeito do consumo de etanol sobre a ação modulatória vascular e concentração do NO	70
5.4.1.4.1. Determinação da concentração de nitrato/nitrito (NO _x) e quantificação dos níveis e NO <i>in situ</i>	70
5.4.2. Efeito do consumo de etanol sobre o balanço oxidativo.....	75
5.4.2.1. Determinação da concentração de O ₂ ^{•-} e da atividade da SOD	75
5.4.2.2. Efeito do consumo de etanol sobre a ação modulatória vascular de O ₂ ^{•-}	77
5.4.2.3. Determinação da concentração de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) e da atividade da catalase e GPx	80
5.4.3. Efeitos do consumo de etanol sobre mediadores pró-inflamatórios no PVAT	81

5.4.3.1. Determinação das concentrações de MCP-1, RANTES e TNF- α e das atividades de MPO e NAG	81
5.4.3.2. Determinação do recrutamento de macrófagos	84
6. DISCUSSÃO	88
7. CONCLUSÃO	101
8. REFERÊNCIAS	103

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1. Consumo de etanol e doenças cardiovasculares

O etanol é uma das substâncias mais consumidas entre a população das mais diversas culturas, somando aproximadamente 2,3 bilhões de pessoas em todo o mundo [1]. De acordo com a organização mundial da saúde (OMS) cerca de 3,3 milhões de mortes por ano no mundo estão associadas com o consumo de etanol [2]. Dessa forma, o uso nocivo do álcool tem um impacto relevante na morbidade, mortalidade e incapacidade em todo o mundo [3].

O uso abusivo dessa substância representa um grande ônus social e econômico, já que os custos não se restringem apenas para o tratamento da dependência alcoólica, mas para um conjunto de doenças relacionadas ao etanol, o que totaliza mais de 200 problemas de saúde [4]. O etanol leva à inúmeras alterações fisiológicas em quase todos os tecidos devido sua capacidade de se distribuir na maioria dos compartimentos fluidos do organismo, incluindo o fígado, onde é metabolizado, sistema nervoso central (SNC), rins, pulmões, trato gastrointestinal, pâncreas e sistema cardiovascular [5]. Com relação às alterações do sistema cardiovascular, Lian (1915) foi o primeiro a documentar relação direta de causa e efeito entre o consumo de etanol e o aumento da pressão arterial em humanos [6-8]. Posteriormente, inúmeros estudos clínicos e experimentais demonstraram que o consumo crônico de etanol é um importante fator de risco no desenvolvimento da hipertensão, uma vez que ocorrem alterações significativas das funções cardíaca e circulatória [9-14] Dada a alta prevalência da hipertensão em todo o mundo, uma das recomendações da Sociedade Internacional de Hipertensão [15], Sociedade Europeia de Cardiologia e Hipertensão [16] e *American Heart Association* [17] é limitar o consumo diário de etanol.

São extremamente complexos os efeitos do etanol no sistema cardiovascular e esses efeitos parecem depender da dose e modo de consumo de etanol [18, 19]. É importante ressaltar que a associação entre a quantidade de etanol consumida e os níveis pressóricos é

do tipo J, em que o consumo de baixas concentrações de etanol promove efeitos benéficos à pressão arterial, enquanto em altas concentrações, esse composto induz aumento da pressão arterial [7, 9].

Nos Estados Unidos da América foi estabelecido que uma dose de etanol equivale à 14 gramas de etanol, correspondendo à 340 ml de cerveja (5%), 40 ml de vodka (40%) ou 150 ml de vinho (12%) [20]. Em seres humanos, enquanto o consumo moderado (entre três e cinco doses diárias) ou abusivo de etanol (superior a seis doses diárias) [8] induz aumento da pressão sistólica (>150-160 mmHg) e diastólica (>95 mmHg) [8, 9] o consumo de uma ou duas doses diárias não estão associados ao aumento da pressão arterial [9], porém metodologias epidemiológicas mais recentes questionam essa associação benéfica [19].

Modelos animais foram utilizados na tentativa de esclarecer os mecanismos pelos quais o consumo de etanol aumenta a pressão arterial. Como consequência deste conjunto de estudos, algumas teorias foram propostas para explicar a hipertensão arterial associada ao consumo crônico de etanol. Os dados apoiam aumento da atividade simpática, estimulação do sistema renina-angiotensina aldosterona (SRAA), aumento de Ca^{2+} intracelular na musculatura lisa com consequente aumento na reatividade vascular, estresse oxidativo e disfunção endotelial [21]. Dentre esses mecanismos propostos destacam-se as alterações na contratilidade vascular e alterações neuro-humorais. No que concerne ao mecanismo miogênico, sugere-se que o consumo de etanol induz aumento da contratilidade vascular [22-26]. Ao se referir sobre as alterações neuro-humorais, há relevante participação do SRAA nas alterações cardiovasculares induzidas pelo etanol [27].

1.2. Consumo de etanol e a ativação do SRAA

Foi descrito que o consumo crônico de etanol ativa o SRAA [28-30]. No SRAA clássico, a enzima renina cliva o seu substrato, angiotensinogênio, formando o decapeptídeo angiotensina I (ANG I), que sofre a clivagem pela enzima conversora da angiotensina (ECA), gerando a angiotensina II (ANG II), que é o peptídeo biologicamente ativo do

sistema produzido sistemicamente e localmente na parede vascular [31, 32]. O peptídeo ANG II exerce suas ações por meio de dois receptores acoplados à proteína G, denominados AT₁ e AT₂. As ações fisiológicas da ANG II são principalmente mediadas pelo receptor AT₁ e incluem vasoconstrição, reabsorção renal de Na⁺, proliferação, crescimento e diferenciação celular, aumento da atividade simpática, secreção de aldosterona e aumento da pressão arterial, fazendo do SRAA um elemento criticamente envolvido no controle fisiológico da pressão arterial [31]. No entanto, além dos efeitos de controle fisiológico da função cardiovascular, a ANG II também está envolvida na fisiopatologia de doenças cardiovasculares. Foi visto aumento da atividade da renina e da produção da ANG II em humanos que faziam o uso de etanol [33-35]. Da mesma forma, houve aumento da atividade da renina e da ECA e elevação nos níveis vasculares e plasmáticos de ANG I, ANG II e aldosterona circulantes em ratos cronicamente tratados com etanol [27, 29, 36, 37]. É importante ressaltar que em condições patológicas, como a hipertensão arterial, o sistema gerador de ANG II vascular é capaz de intensificar os efeitos do SRAA sistêmico [38]. Portanto, o SRAA é apontado como importante efector das ações cardiovasculares induzidas pelo etanol. Em conjunto, esses estudos mostraram que o SRAA participa do aumento da pressão arterial e da disfunção vascular induzida pelo etanol e evidenciaram a existência de uma relação entre o mecanismo neuroendócrino e miogênico que poderia explicar a hipertensão arterial associada ao consumo de etanol [27].

A ANG II é um peptídeo que, além dos efeitos mencionados acima na função cardiovascular, promove a formação de ERO no endotélio e músculo liso vascular por meio da ativação do receptor AT₁ e subsequente ativação da enzima β -nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida [NAD(P)H] oxidase [27, 31, 39-41]. A NAD(P)H oxidase é um complexo enzimático que tem como função principal a produção de ERO, sendo a principal fonte de ERO nas células vasculares do endotélio e do músculo liso [31]. Essa enzima é formada por subunidades de membrana e citosólicas, a qual catalisa a produção de

ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) pela redução de oxigênio molecular (O_2) usando NADPH ou NADH como doadores de elétron [42]. A “família Nox das NAD(P)H oxidases” compreende sete membros, caracterizados pela subunidade catalítica que utilizam: Nox1, Nox2 (ou gp91phox), Nox3, Nox4 (ou *renox – renal oxidase* – oxidase renal), Nox5 e Duox1 e Duox2 [43]. As células endoteliais expressam as isoformas Nox1, Nox2, Nox4 e Nox5 [44, 45], enquanto as células do músculo liso vascular expressam Nox1, Nox4 e Nox5 [45], sendo que a última é expressa em humanos, porém não é encontrada em roedores [46].

A relação causal entre produção de ERO e a hipertensão arterial provavelmente ocorre em âmbito vascular, pelo menos em parte, onde o estresse oxidativo promove disfunção endotelial, inflamação vascular, alteração da reatividade e remodelamento estrutural, levando ao aumento da resistência periférica e, por conseguinte ao aumento da pressão arterial [31, 47]. As ERO desempenham função importante nas alterações vasculares induzidas pelo consumo de etanol uma vez que induzem disfunção endotelial e alteração da contratilidade vascular [48, 49]. O consumo de etanol aumenta a expressão de componentes da enzima NAD(P)H oxidase na vasculatura, onde ela é responsável pela geração de ERO e alteração da resposta vascular [50, 51]. É importante ressaltar que a ANG II é responsável pela ativação da NAD(P)H oxidase em vasos de animais tratados cronicamente com etanol [27]. Essa ativação leva ao aumento da expressão da subunidade Nox1, aumento da produção de $O_2^{\cdot-}$ e aumento da contratilidade vascular [27, 41].

As ERO também podem reagir com moléculas que participam do controle do tônus vascular, como óxido nítrico (NO) [52]. O $O_2^{\cdot-}$ formado na vasculatura reage com o NO, reduzindo sua biodisponibilidade e gerando espécies reativas oxidantes secundárias, como o peroxinitrito ($ONOO^{\cdot-}$), um potente oxidante capaz de causar disfunção vascular e nitração de resíduos de tirosina em proteínas [53]. Outra importante consequência dessa reação é a perda da bioatividade do NO, com consequente redução da capacidade vasodilatadora dependente do endotélio [54]. A enzima NO sintase (NOS) sintetiza o NO e três isoformas

distintas dessa enzima são descritas: NOS neuronal (nNOS ou tipo I), NOS induzível (iNOS ou tipo II) e NOS endotelial (eNOS ou tipo III) [55]. O consumo de etanol interfere com a síntese e biodisponibilidade do NO na vasculatura, sendo que estes processos estão relacionados principalmente à reação do NO com o $O_2^{\cdot-}$ e a redução da expressão das isoformas da NOS [50, 56, 57]. É importante ressaltar que a redução da biodisponibilidade de NO no vaso de animais tratados cronicamente com etanol é prevenida pelo losartan, fato que implica a ANG II nessa resposta [27]. Esse conjunto de dados sugere que o estresse oxidativo vascular induzido pelo etanol é mediado pela ANG II e é responsável pela disfunção vascular associada ao consumo crônico desse composto.

1.3. O tecido adiposo perivascular e a modulação do tônus vascular

Os vasos sanguíneos são constituídos por três camadas, a túnica íntima, túnica média e a túnica adventícia. Entretanto, além dessas três camadas, os vasos sanguíneos possuem a túnica adiposa, denominada tecido adiposo perivascular (*Perivascular Adipose Tissue* – PVAT) que envolve a maioria dos vasos sanguíneos sistêmicos, exceto os vasos cerebrais [58]. Esse tecido se encontra imediatamente adjacente à túnica adventícia e é composto por adipócitos, células imunes, fibroblastos e células endoteliais [59]. Além de ser considerado uma estrutura de suporte e armazenamento lipídico, o PVAT possui propriedades secretórias e agindo de maneira autócrina, parácrina ou endócrina libera substâncias vasoativas que participam da regulação do tônus vascular [60-62]. Portanto, o PVAT é um tipo funcionalmente especializado de tecido adiposo, com diferentes propriedades de desenvolvimento e secreção [62, 63].

Dependendo do leito vascular, o PVAT pode ser composto pelo tecido adiposo marrom (*Brown Adipose Tissue* – BAT) como visto ao redor principalmente da aorta torácica, pelo tecido adiposo branco (*White Adipose Tissue* – WAT) que circunda principalmente pequenas artérias como mesentéricas, femorais e carótidas e até mesmo uma mistura entre WAT e BAT, recebendo a denominação de tecido adiposo bege (*Beige*

Adipose Tissue – BeAT), presente em aortas abdominais e artérias coronais (Figura 1). As diferenças nos fenótipos-genótipos dos adipócitos entre os diferentes locais, resultam em variações funcionais do PVAT [64-66].

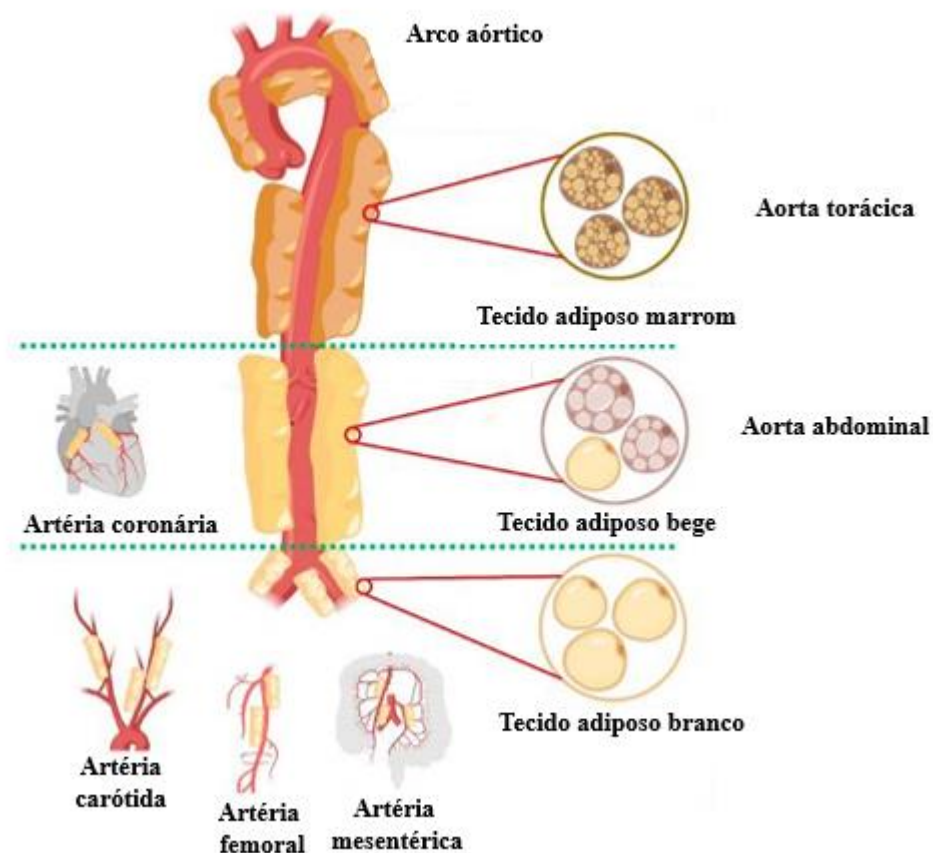


Figura 1. Diferença regional e morfológica de PVAT. Diferentes regiões da vasculatura são circundados por adipócitos distintos associados a diferentes fenótipos-genótipos e diferentes funções parácrinas. Tecido adiposo perivascular (PVAT: Perivascular Adipose Tissue). Adaptado de Chen *et al.*, 2023.

O PVAT, fisiologicamente, apresenta efeito de reduzir a resposta contrátil à agentes vasoconstritores. Soltis e Cassis (1991) demonstraram pela primeira vez que o PVAT diminuía a potência da resposta contrátil induzida pela noradrenalina em aortas de ratos [67]. Uma década mais tarde, a ação anti-contrátil do PVAT foi confirmada por Lohn *et al.* (2002) [68], e atualmente sabe-se que o PVAT produz vários fatores vasorelaxantes como o NO [69], sulfeto de hidrogênio (H₂S) [70], peróxido de hidrogênio (H₂O₂) [71, 72], adipocinas (ex. adiponectina, leptina e resistina) [73-75], prostaciclina (PGI₂) [76], metil palmitato

(PAME) [77] e a angiotensina (1–7) [78]. Em conjunto, essas moléculas medeiam o efeito anti-contrátil do PVAT em diferentes vasos por meio de mecanismos independentes e dependentes do endotélio [58].

Além disso, o PVAT também produz fatores de contração que incluem noradrenalina, ERO, ANG II, IL-6, TNF- α e quemerina [60, 62]. O PVAT expressa diversas proteínas que regulam a produção e eliminação desses fatores contráteis e relaxantes como a enzima NAD(P)H oxidase, eNOS, ciclooxigenase (COX)1 e COX2 e as isoformas da enzima superóxido dismutase (SOD) [60, 79, 80]. Além disso, a expressão da enzima iNOS também foi descrita em PVAT de aorta de ratos em condição de endotoxemia [81].

1.4. Disfunção do tecido adiposo perivascular e doenças cardiovasculares

Como mencionado anteriormente, em condições fisiológicas, o PVAT apresenta efeito protetor e benéfico na regulação do tônus vascular, liberando majoritariamente fatores vasorelaxantes. Entretanto, em situações não fisiológicas pode ocorrer modificação do fenótipo anti-contrátil desse tecido [82], como consequência, há perda de sua ação anti-contrátil que é resultado de aumento da produção de fatores de contração e redução da biodisponibilidade de fatores de relaxamento, tornando o PVAT disfuncional [66] (Figura 2).

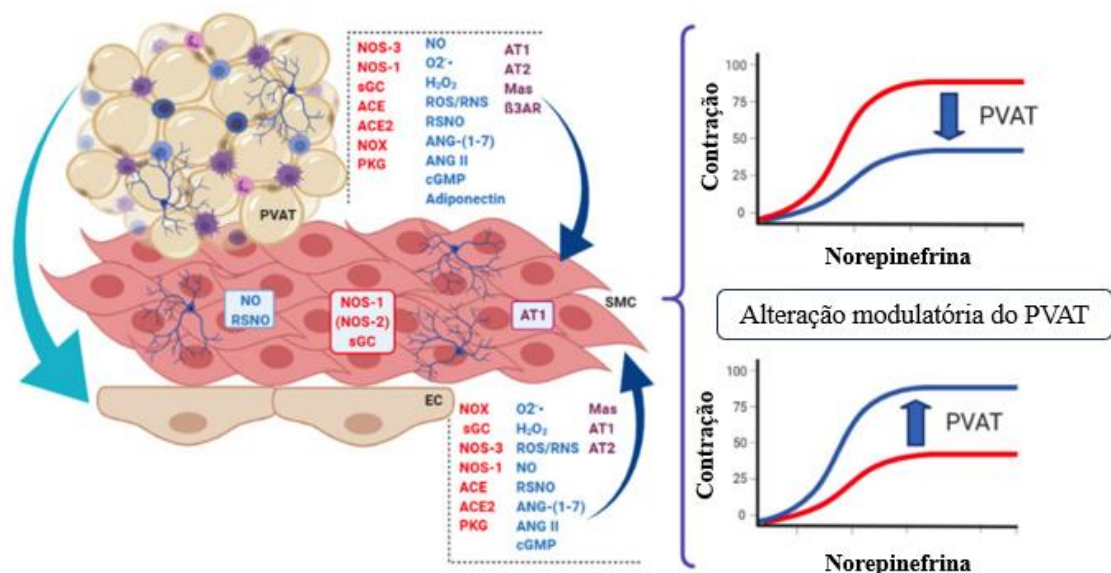


Figura 2. Alguns dos principais mediadores (em azul), enzimas (em vermelho) e receptores (em roxo) presentes nas células endoteliais (EC) e no tecido adiposo perivascular (PVAT) que influenciam as células musculares lisas (SMC). O PVAT tem ação modulatória na função endotelial e no tônus vascular. O PVAT fisiologicamente apresenta efeitos anti-contráteis (curvas superiores) pela liberação predominantemente de fatores relaxantes, entretanto em situações fisiopatológicas, predomina-se os fatores contráteis e o PVAT perde seu efeito anti-contrátil ou assume características pró-contráteis (curvas inferiores) na resposta dos vasos. O PVAT é contemplado por adipócitos, inervação (neurônios) e células imunológicas (linfócitos, macrófagos e eosinófilos) e vasos (não mostrados) em sua composição. NOS-3: isoforma NOS endotelial; NOS-1: isoforma NOS neuronal, NOS-2: isoforma NOS induzível; NOX: NADPH oxidases; sGC: guanilato ciclase solúvel; ECA: enzima conversora de angiotensina; ECA2: isoforma 2 da ECA; NO: óxido nítrico; O₂⁻: ânion superóxido; H₂O₂: peróxido de hidrogênio; ROS/RNS: espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, respectivamente; RSNO: S-nitrosotióis proteicos e de baixo peso molecular; ANG (1-7): angiotensina (1-7); ANG II: angiotensina II; cGMP: GMP cíclico; AT₁: receptor AT₁ da angiotensina; AT₂: receptor AT₂ da angiotensina; Mas: receptor Mas; β₃AR: receptor beta-3 adrenérgico; PKG: proteína quinase G. Fonte: Barp *et al.*, 2021.

A disfunção do PVAT caracterizada, por exemplo, pela secreção prejudicada de adipocinas juntamente com a disfunção endotelial, aumenta os riscos cardiovasculares [83]. Durante a hipertensão e obesidade foi demonstrado que o PVAT deixa de produzir seu efeito anti-contrátil por meio de alterações na produção da leptina, adiponectina e pelo desacoplamento da eNOS, ocasionando a redução da produção de NO e aumento da produção de O₂⁻, favorecendo a disfunção endotelial [74, 84-86]. O PVAT expressa proteínas que estão relacionadas à produção de ERO e também à eliminação dessas moléculas oxidantes como, por exemplo, a NAD(P)H oxidase, eNOS e enzimas

antioxidantes [87, 88]. As ERO produzidas em decorrência de alterações fisiopatológicas no PVAT podem promover disfunção endotelial que é o resultado da redução da biodisponibilidade de NO ou da modulação da inflamação perivascular que posteriormente irá afetar a função endotelial [86, 89]. Por isso, as ERO produzidas pelo PVAT são importantes mediadoras da disfunção vascular em diferentes condições [63].

Além disso, algumas situações fisiopatológicas como a hipertensão arterial, podem iniciar um processo inflamatório no PVAT. A inflamação vascular é um processo característico da hipertensão arterial que é iniciado no PVAT, sendo a ANG II importante mediadora dessa resposta [90]. Ao se referir ao SRAA, ocorre a expressão dos principais componentes do mesmo particularmente no PVAT da aorta torácica e artéria mesentérica de humanos e roedores, incluindo o angiotensinogênio, ECA, aldosterona e os receptores AT₁ e AT₂ [74, 91]. Dessa forma, a ANG II promove efeitos diretos no PVAT. De fato, a ANG II regula as etapas iniciais do processo inflamatório associado à hipertensão arterial e também desempenha função importante na manutenção dessa resposta. Durante a progressão do estado hipertensivo, células do sistema imunológico se acumulam no PVAT de artérias de resistência e condução como a artéria mesentérica e aorta. A ANG II induz acúmulo de linfócitos T e de macrófagos no PVAT [90, 92]. A infiltração de macrófagos no PVAT mediada pela ANG II é dependente da ativação dos receptores AT₁ [93, 94]. No PVAT, os macrófagos infiltrados, tanto do tipo M1 como M2 produzem citocinas pró-inflamatórias (ex. IL-6, TNF α e IFN- γ) e regulam liberação de adipocinas levando a alterações da estrutura e funcionalidade do PVAT [63]. Já em relação à infiltração de linfócitos T, foi descrito que a ANG II induz aumento da expressão de RANTES (*regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*) [também conhecida como quimiocina CCL5] no PVAT e essa resposta está diretamente associada ao aumento de linfócitos T nesse tecido e consequente aumento de ERO e disfunção vascular [90].

É importante notar que o tempo para que as alterações da funcionalidade do PVAT ocorram é um fator importante para o entendimento da contribuição desse tecido para a alteração da função vascular. Nesse sentido, quanto maior o tempo de exposição à condição de risco cardiovascular, maior possibilidade de perda da ação anti-contrátil do PVAT [95, 96].

1.5. O tecido adiposo perivascular e o consumo de etanol

Apesar de estar bem estabelecido que o consumo de etanol induz disfunção vascular, há pouca informação acerca dos efeitos do consumo de etanol sobre o PVAT. Estudo de nosso grupo mostrou que a administração de dose única de etanol (1 g/kg) promoveu aumento da resposta anti-contrátil do PVAT por um mecanismo que envolveu aumento da produção de H_2O_2 [71], demonstrando um efeito protetor. Entretanto, o consumo crônico de etanol resultou em um PVAT periaórtico com produção aumentada de ERO derivadas da NADPH oxidase, bem como uma redução da biodisponibilidade de NO [97]. Mais recentemente, foi descrito que o consumo de etanol induz a perda do efeito anti-contrátil do PVAT que envolve as artérias mesentéricas, promovendo aumento de produção de ERO. Além disso, o etanol induz o recrutamento intravascular de neutrófilos, mostrando que o PVAT pode mudar para um fenótipo pró-inflamatório em resposta ao etanol [98]. No entanto, não há dados que evidenciem o mecanismo mais detalhado do efeito do etanol no PVAT e nem se esses efeitos precedem o estabelecimento da hipertensão.

JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

As doenças cardiovasculares figuram como as principais causas de morte não só no Brasil, mas em todo o mundo. [99, 100] O uso nocivo de etanol, juntamente com dieta inadequada, sedentarismo e uso de tabaco são reconhecidos como os principais fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares [101]. O consumo frequente e exagerado de bebida alcoólica em nosso país abrange parcela significativa da população e por esse motivo torna-se pertinente o entendimento dos mecanismos associados aos danos cardiovasculares induzidos pelo consumo de etanol. A hipertensão arterial associada ao consumo de etanol é um processo complexo e multimediado [102]. Nesse cenário, as alterações vasculares e neuro-humorais figuram como mecanismos centrais associados aos danos cardiovasculares induzidos pelo consumo de etanol [103]. Uma vez que o PVAT possui importante participação na regulação da função vascular, a hipótese do estudo é a de que o etanol, via receptores AT₁, irá alterar a produção/ação de fatores vasorelaxantes derivados do PVAT, além de estimular o recrutamento de células inflamatórias que promoverão prejuízo no efeito anti-contrátil do PVAT por mecanismos associados ao aumento da produção de ERO e diminuição da biodisponibilidade de NO.

O PVAT é um órgão metabolicamente ativo que, em condições não fisiológicas, contribui para o aparecimento e progressão de doenças cardiovasculares [82]. Assim, entender o papel preciso do PVAT nos efeitos vasculares do etanol é de grande interesse. Apesar de alguns estudos sugerirem que o PVAT possa ser um alvo dos efeitos do etanol, o mecanismo exato pelo qual o etanol promove a perda do efeito anti-contrátil do PVAT ainda precisa ser esclarecido.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O presente estudo foi delineado com o objetivo de investigar a participação dos receptores AT₁ na disfunção do PVAT induzida pelo consumo de etanol.

3.2 Objetivos específicos

- Investigar se o consumo de etanol promove hipertensão arterial em diferentes períodos de tratamento;
- Investigar se o consumo de etanol modula as alterações funcionais do PVAT em diferentes momentos (pré-hipertensão e durante a hipertensão) de tratamento com etanol em ratos, o que permite avaliar a possível contribuição da disfunção do PVAT para o aparecimento e/ou manutenção do estado hipertensivo induzido pelo etanol, uma vez que a alteração do fenótipo do PVAT é influenciada pelo tempo;
- Avaliar se o tratamento com o losartan é capaz de prevenir a perda do efeito anti-contrátil do PVAT e a hipertensão arterial induzida por etanol, permitindo a avaliação da participação do receptor AT₁ nessas respostas;
- Averiguar os possíveis mecanismos pelos quais o etanol via receptor AT₁ promove disfunção do PVAT, determinando quais fatores provenientes do PVAT estão alterados e que contribuem para a disfunção vascular;
- Avaliar se o consumo de etanol promove uma resposta inflamatória no PVAT e o possível envolvimento do receptor AT₁.

MATERIAIS E MÉTODOS

4 MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizados ratos *Wistar Hannover* adultos, com idade média entre 8-10 semanas (260-280g), provenientes do Biotério Central do *Campus* da USP de Ribeirão Preto. Durante o tratamento os animais permaneceram no biotério de manutenção da EERP-USP com temperatura controlada por ar condicionado tipo *slipt* (20-22°C), ciclo automático claro/escuro de 12 h e livre acesso à água (ou solução de etanol) e ração. Os ratos permaneceram em *rack* ventilada (AL21, Alesco, Brasil) mantidos em grupos de 2 em mini-isoladores de polissulfona com área de 1.612 cm² tendo cama de maravalha trocada 3 vezes por semana. Os protocolos utilizados nesse estudo estão de acordo com as leis do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da EERP/USP (19.1.937.22.3).

4.2. Grupos experimentais

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos:

- 1) Controle: animais tiveram livre acesso a água e ração padrão Nuvilab® e receberam solução salina por gavagem (veículo do losartan) no volume de administração de 10 ml/kg;
- 2) Etanol: animais tiveram livre acesso exclusivamente a uma solução de etanol a 20% (vol./vol.) e ração padrão Nuvilab® e receberam solução salina por gavagem;
- 3) Losartan: animais tiveram livre acesso a água e ração Nuvilab® e receberam solução de losartan (10 mg/kg/dia) por gavagem diluído em salina no volume de administração de 10 ml/kg;
- 4) Etanol-losartan: animais tiveram livre acesso a solução de etanol a 20% (vol./vol.) e ração Nuvilab® e receberam solução de losartan (10 mg/kg/dia) por gavagem.

Os animais do grupo etanol foram condicionados a um período de adaptação que consistiu no fornecimento de etanol em concentrações crescentes semanais de 5 e 10% na primeira e

segunda semanas, respectivamente. A partir da 3^a semana até a 9^a semana de tratamento, os animais receberam solução de etanol 20% (Figura 3). Concentrações de etanol no sangue variando de 40 a 50 mmol/l foram previamente encontradas em estudos usando o mesmo protocolo de tratamento com etanol aqui descrito [30, 102]. Essa concentração de etanol está dentro da faixa encontrada em consumidores crônicos [104]. Ao término da 3^a e 9^a semanas, os animais foram anestesiados intraperitonealmente com uretana 1,25 g/kg em solução de 25% (5 ml/kg, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e mortos por exsanguinação seguida de rompimento do diafragma. Para realização dos experimentos funcionais (3^a e 9^a semanas) foram coletadas aortas torácicas com ou sem PVAT (PVAT(+) e PVAT(-), respectivamente), com e sem endotélio (Endo(+) e Endo(-), respectivamente) e para o restante dos experimentos o PVAT periaórtico e a aorta torácica foram coletados ao término da 3^a semana.

A participação do receptor AT₁ nas alterações induzidas pelo etanol no PVAT foi avaliada com tratamento diário de losartan (10 mg/kg/dia, gavagem), um antagonista seletivo dos receptores AT₁. A dose e a via de administração de losartan já foram previamente utilizadas para avaliar a participação do receptor AT₁ no PVAT e nas disfunções endoteliais/vasculares em diferentes modelos experimentais [27, 105-107]. O losartan é amplamente utilizado como ferramenta farmacológica por ter ação de longa duração e na vasculatura, o mesmo promove significativa redução da geração de ERO, aumento da biodisponibilidade de NO, aumento da capacidade antioxidante, além de restaurar a função endotelial/vascular e a pressão arterial [27, 107, 108].

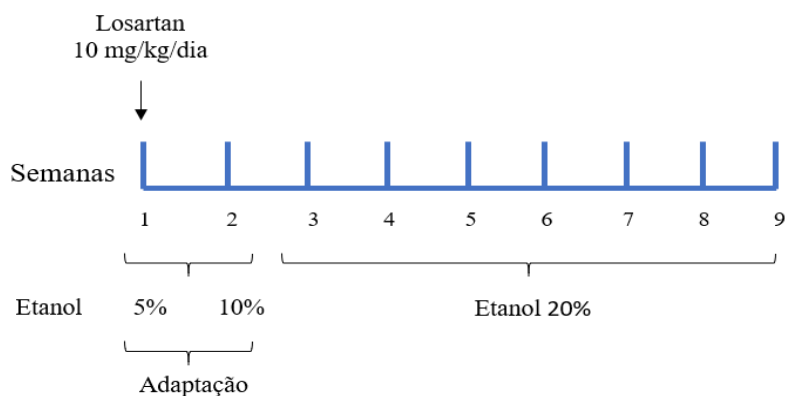


Figura 3. Modelo de tratamento com etanol. Os animais do grupo etanol passaram por um período de adaptação de 2 semanas que consistiu no fornecimento de etanol em concentrações crescentes de 5 e 10% (vol./vol.). Em seguida os animais tiveram acesso à solução de etanol 20% (Tirapelli *et al.*, 2006). A participação do receptor AT_1 na alteração do efeito modulatório do PVAT foi avaliada com o uso de losartan (10 mg/kg/dia) por via oral (gavagem). Os experimentos funcionais foram realizados ao término da 3ª e 9ª semanas de tratamento. Os experimentos bioquímicos foram realizados ao término da 3ª semana de tratamento com o intuito de entender os mecanismos moleculares associados à alteração da função do PVAT induzida pelo etanol.

4.3. Evolução temporal do consumo de líquido e ração pelos animais

Objetivo: Verificar se o consumo de etanol e o tratamento com losartan influenciam o consumo de líquido e a ingestão de ração dos animais

Medidas semanais foram realizadas para avaliar a ingestão de líquidos (água ou solução de etanol) e o consumo de ração dos quatro grupos experimentais durante o período de tratamento. Os resultados foram expressos em gramas (g) do consumo médio de ração de cada grupo e a quantidade em mililitros (ml) do consumo médio de líquidos.

4.4. Medida da pressão arterial

Objetivo: Verificar se o receptor AT_1 participa do aumento da pressão arterial em animais tratados com etanol.

Durante 9 semanas a pressão arterial sistólica foi aferida em ratos acordados utilizando o pletismógrafo EFF306 (Insight, Ribeirão Preto, SP, Brasil). O procedimento requer aquecimento prévio dos animais em um compartimento à 37 °C por 15 minutos, em seguida a porção proximal da cauda é ajustada ao oclusor acoplado a um transdutor

pneumático caudal elétrico conectado a um sistema de transdução, o que permite a leitura dos níveis pressóricos. Antes de iniciar a pletismografia de cauda, foi realizada adaptação dos animais por período de três dias, nos quais foram realizadas aferições da pressão arterial. Após esse período, foram registradas as medidas de pressão arterial sistólica baseando-se na média aritmética das três melhores medidas de pressão arterial após estabilização das medidas. Os resultados estão apresentados em mmHg.

Após o término do tratamento (3 e 9 semanas), também foram obtidos os valores da pressão arterial sistólica, diastólica e média de maneira invasiva utilizando o aparelho PowerLab. Os animais foram anestesiados com cetamina (80 mg/kg) e xilasina (10 mg/kg) para o procedimento de introdução de uma cânula heparinizada (segmento de 4 cm de PE-10 ligado a um segmento de 13 cm de PE-50) na artéria femoral dos mesmos. Os cateteres foram introduzidos por via subcutânea e exteriorizados na parte de trás do pescoço. Após 24 horas da cirurgia, a cânula arterial foi conectada a um transdutor de pressão e os valores de pressão e batimentos cardíacos foram registrados por 10 minutos em ratos em movimento livre usando um sistema de aquisição de dados (MP150CE; Biopac Systems Inc., CA, USA). Os dados foram analisados e extraídos utilizando o software Labchart e foram expressos em mmHg ou batimentos por minuto (BPM).

4.5. Estudo funcional da reatividade vascular em aortas PVAT(+) e PVAT(-)

Objetivo: 1) Verificar se o tratamento com etanol afeta o efeito anti-contrátil do PVAT e a possível participação do receptor AT_1 nessa resposta. 2) Avaliar os possíveis mecanismos envolvidos;

A aorta torácica foi isolada e cortada em anéis de 5 mm e mantida sob tensão de 15 mN em banho de órgão isolado [37°C e gaseificados com mistura carbogênica (95% O_2 e 5% CO_2)] e os procedimentos foram feitos conforme descrito anteriormente [109]. A reatividade vascular foi estudada por meio da obtenção de curvas concentração-resposta para

fenilefrina (10 nmol/l a 10 μ mol/l) ao término da 3^a e 9^a semana de tratamento e serotonina (10 nmol/l a 100 μ mol/l) ao término apenas da 3^a semana de tratamento em aortas PVAT(-) e PVAT(+), endo (+) e endo (-). Os mecanismos envolvidos na alteração da função anti-contrátil do PVAT foram investigados em aortas de animais após a 3^a semana de tratamento com etanol. Para avaliação desses mecanismos, curvas dose-resposta para fenilefrina foram obtidas após incubação por 30 min com os seguintes compostos: A779 (1 μ mol/l, antagonista do receptor *Mas*), L-NAME (100 μ mol/l, inibidor não seletivo das NOS), tiron (10³ μ mol/l, sequestrador de O₂⁻) ou RO1138452 (1 μ mol/l, antagonista seletivo do receptor de prostaciclina (PGI₂) IP). As concentrações dos inibidores foram baseadas em estudos prévios [72, 110-112]. A partir das curvas dose-resposta, foram determinados por regressão não linear os valores de pD₂ que consiste no logaritmo negativo da concentração molar do agente vasoativo que promove 50% do efeito máximo (EC₅₀), bem como os respectivos efeitos máximos (E_{max}), que foram expressos em mN.

4.6. Avaliação das concentrações dos fatores relaxantes derivados do PVAT

Objetivo: Verificar se o tratamento com etanol afeta a concentração dos fatores relaxantes dependentes do endotélio derivados do PVAT e a possível participação do receptor AT₁ nessa resposta.

4.6.1. Determinação da concentração de adiponectina

A concentração tecidual de adiponectina foi avaliada por enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) seguindo as instruções de um kit comercialmente disponível (MRP300, R&D systems, Minneapolis, EUA). O PVAT aórtico dos animais de cada grupo experimental foi homogeneizado em tampão fosfato (PBS) pH 7,4 (20 mmol/l de KH₂PO₄, 1 mmol/l de EGTA e 150 mmol/l de sacarose) utilizando um homogeneizador de vidro e centrifugado (6.500 x g, 10min, 4°C) e posteriormente diluído 1000 vezes. 50 μ l de amostra e padrão foram transferidos para uma placa de 96 poços, após 60 minutos de

incubação, cada poço foi lavado 4 vezes com 300 µl de tampão de lavagem. Em seguida, 100 µl do conjugado de adiponectina foi adicionado aos poços, após 60 minutos de incubação, a placa foi novamente lavada como descrito anteriormente. 100 µl de substrato foi adicionado aos poços, após 30 minutos de incubação, os poços foram novamente lavados. Por fim foi adicionado o volume de 100 µl da solução de parada nos poços e a placa foi lida. A concentração de adiponectina foi determinada colorimetricamente a 450 nm. Os resultados foram expressos em ng/mg de proteína.

4.6.2. Determinação da concentração de leptina

A concentração tecidual de leptina foi avaliada por ELISA seguindo as instruções de um kit comercialmente disponível (#1007609, Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI). O PVAT aórtico dos animais de cada grupo experimental foi homogeneizado em PBS, pH 7,4 (20 mmol/l de KH_2PO_4 , 1 mmol/l de EGTA e 150 mmol/l de sacarose) utilizando um homogeneizador de vidro e centrifugado (6.500 x g, 10min, 4°C) e posteriormente diluído 10 vezes. Cada poço foi inicialmente lavado 5 vezes com 300 µl de tampão de lavagem. 100 µl de amostra e padrão foram transferidos para uma placa de 96 poços, após 60 minutos de incubação, cada poço foi lavado por 3 vezes com 300 µl de tampão de lavagem. Em seguida, 100 µl do anticorpo foi adicionado aos poços, após 60 minutos de incubação, a placa foi novamente lavada como descrito anteriormente. 100 µl de estreptavidina-HRP foi adicionado aos poços, após 30 minutos de incubação, os poços foram novamente lavados. Em seguida, 100 µl de substrato foi adicionado e deixado 10 minutos de incubação. Por fim foi adicionado o volume de 100 µl da solução de parada nos poços e a placa foi lida. A concentração de leptina foi determinada colorimetricamente a 450 nm. Os resultados foram expressos em pg/mg de proteína.

4.6.3. Determinação dos níveis de NO

4.6.3.1. Determinação da concentração de nitrato/nitrito (NO_x)

A concentração tecidual de NO_x foi avaliada seguindo as instruções de um kit comercialmente disponível (#780001, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Michigan, EUA). O PVAT periaórtico dos animais de cada grupo experimental foi homogeneizado em 300 µl de PBS pH 7,4 (20 mmol/l de KH₂PO₄, 1 mmol/l de EGTA e 150 mmol/l de sacarose) utilizando um homogeneizador de vidro e centrifugado (10000 xg por 20 min a 4°C). Em seguida, 160 µl dos sobrenadantes obtidos foram centrifugados (14000 g por 30 min, a 24°C) em dispositivos de ultrafiltração (#UFC5010BK, Amicon Ultra-0.5 ml 10 kDa, Millipore, Billerica, MA, EUA). As amostras ultrafiltradas foram utilizadas em um ensaio colorimétrico baseado na reação do nitrato/nitrito com o reagente de Griess, que tem como produto um diazo-composto de coloração rosa. A concentração de nitrato/nitrito (NO_x) foi determinada colorimetricamente a 540–550 nm. Os resultados foram expressos em nmol/mg de proteína.

4.6.3.2. Visualização de NO *in situ*

A sonda fluorescente 4,5-Diaminofluoresceína (DAF-2DA) foi utilizada para a visualização da formação de NO *in situ*. As amostras de aorta torácica com PVAT foram coletadas e embebidas em Tissue-Tek® - OCT™ (Sakura Finetek, Torrance, CA, EUA) e congelados em nitrogênio líquido. Em seguida, os tecidos foram cortados em criostato (5 µm de espessura) e incubados com a sonda DAF-2DA (10 µmol/l diluídos em tampão PBS pH 7,4) por 30 minutos em câmara úmida, escura e à 37°C. Para visualização das secções do vaso com o PVAT foi utilizado um microscópio de fluorescência acoplado à câmera fotográfica (Leica Imaging Systems Ltd., Cambridge, England), as secções de aorta juntamente com o PVAT foram visualizadas utilizando 490 nm (λ excitação) e 515 nm (λ emissão). As imagens dos cortes foram fotografadas em um aumento de 400x e representam, qualitativamente, a produção

de NO tecidual. Para avaliar a intensidade de fluorescência, foi utilizado o software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA). Uma média aritmética de 10 campos por imagem foi calculada. Os resultados foram expressos como intensidade de fluorescência (unidade arbitrárias).

4.6.4. Determinação da concentração de 6-keto-PGF1 α

A concentração de PGI₂ foi avaliada por ELISA de acordo com a quantificação de 6-keto-PGF1 α (metabólito estável de PGI₂) seguindo as instruções de um kit comercialmente disponível (#515211, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EUA). O PVAT aórtico dos animais de cada grupo experimental foi homogeneizado em 300 μ l de tampão de imunoenensaio enzimático utilizando um homogeneizador de vidro e centrifugado (2.000 x g por 15 min a 4°C). Após desproteinização com etanol absoluto, as amostras foram mantidas a -20°C por 30 min. Em seguida, o sobrenadante foi centrifugado (4.000 x g por 10 min a 25°C) e transferido para uma microplaca de 96 poços. A concentração de 6-keto-PGF1 α foi determinada colorimetricamente a 420 nm. Os resultados foram expressos em pg/mg de proteína.

4.7. Avaliação do estresse oxidativo no PVAT: determinação da geração de ERO

Objetivo: Verificar se o tratamento com etanol afeta o balanço oxidativo no PVAT e a participação do receptor AT₁ nessa resposta.

4.7.1. Determinação da concentração de O₂^{•-}

A técnica de quimioluminescência da lucigenina foi usada para avaliar a produção de O₂^{•-} no PVAT. O PVAT periaórtico dos animais de cada grupo experimental foi homogeneizado em PBS, pH 7,4 (20 mmol/l de KH₂PO₄, 1 mmol/l de EGTA e 150 mmol/l de sacarose) utilizando um homogeneizador de vidro. A reação foi iniciada pela adição de NADPH (0,1 mmol/L) a uma suspensão (volume final de 250 μ l) contendo amostra (50 μ l),

lucigenina (5 $\mu\text{mol/l}$) e tampão fosfato pH 7,4. Em todos os protocolos experimentais, o conteúdo proteico das amostras foi analisado pelo método de Lowry (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA). Os resultados foram normalizados pela concentração proteica de cada amostra e expressos como URL (unidades relativas de luz) / mg de proteína.

4.7.2. Visualização de ERO *in situ*

A sonda fluorescente dihidroetideo (DHE) foi utilizada para a visualização da formação de ERO *in situ*. As amostras de aorta torácica com PVAT foram coletadas e embebidas em Tissue-Tek® - OCT™ (Sakura Finetek, Torrance, CA, EUA) e congelados em nitrogênio líquido. Em seguida, os tecidos foram cortados em criostato (5 μm de espessura) e incubados com a sonda DHE (1 $\mu\text{mol/L}$ diluídos em tampão PBS pH 7,4) por 30 minutos em câmara úmida, escura e à 37°C. Para visualização das secções do vaso com o PVAT foi utilizado um microscópio de fluorescência acoplado à câmera fotográfica (Leica Imaging Systems Ltd., Cambridge, England), as secções de aorta juntamente com o PVAT foram visualizadas utilizando 550 nm ($\lambda_{\text{excitação}}$) e 570 nm ($\lambda_{\text{emissão}}$). As imagens dos cortes foram fotografadas em um aumento de 400x e representam, qualitativamente, a produção de ERO tecidual. Para avaliar a intensidade de fluorescência, foi utilizado o *software ImageJ* (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA). Uma média aritmética de 10 campos por imagem foi calculada. Os resultados foram expressos como intensidade de fluorescência (unidade arbitrárias).

4.7.3. Determinação da concentração de H_2O_2

O PVAT dos animais de cada grupo experimental foi homogeneizado em solução de Krebs (mmol/l): NaCl 130; KCl 4,7; KH_2PO_4 1,18; MgSO_4 1,17; NaHCO_3 14,9; Glicose 5,5; CaCl_2 1,6; pH 7,4) utilizando um homogeneizador de vidro e centrifugado (10.000 x g, 4 °C por 5 min). Em seguida, o H_2O_2 foi quantificado utilizando o reagente Amplex® Red (10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine) (#A22188, Invitrogen, Waltham, Massachusetts, MA,

EUA). Para a montagem da placa, a cada 50 µl do sobrenadante obtido foi adicionado 50 µl de *working solution* formado basicamente pelo reagente Amplex® Red (10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine) e a peroxidase *horseradish* (HRP). O reagente, na presença da HRP reage com o H₂O₂ produzindo a resorufina, produto altamente fluorescente (λexcitação 571, λemissão 585 nm). Uma curva padrão de H₂O₂ foi construída e os valores de concentração obtidos foram expressos em µmol/l/mg proteína.

4.8. Avaliação da capacidade antioxidante no PVAT:

Objetivo: Verificar se o tratamento com etanol afeta a maquinaria antioxidante do PVAT e a participação do receptor AT₁ nessa resposta

4.8.1. Determinação da atividade do superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi avaliada seguindo as instruções de um kit comercialmente disponível (#19160 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). O PVAT periaórtico dos animais de cada grupo experimental foi homogeneizado em 300 µl de PBS, pH 7,4 (20 mmol/l de KH₂PO₄, 1 mmol/l de EGTA e 150 mmol/l de sacarose) utilizando um homogeneizador de vidro e centrifugado (4.000 x g por 12 minutos a 4°C). 20 µl de sobrenadante foram adicionados na placa para iniciar a reação. Os resultados foram expressos em % de inibição/mg de proteína, ou seja, a capacidade da SOD em inibir a reação do O₂^{•-} com o tetrazólio, responsável pela formação do formazam, que possui coloração amarela.

4.8.2. Determinação da atividade da catalase

O método é baseado na hidrólise do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em água e oxigênio molecular proporcionalmente à concentração de catalase tecidual. Para tal, amostras contendo catalase são incubadas por 1 minuto à temperatura ambiente em presença de concentrações conhecidas de H₂O₂. Após este tempo, a reação é parada com azida sódica e o remanescente de H₂O₂ é determinado pela oxidação ferrosa do xylenol Orange em meio

ácido, originando um composto arroxeadado, cuja absorvância pode ser monitorada á 560 nm. O PVAT periaórtico dos animais de cada grupo experimental foi homogeneizado em tampão fosfato 50mM, pH 7,4 (20 mmol/l de KH_2PO_4 , 1 mmol/l de EGTA e 150 mmol/l de sacarose) utilizando um homogeneizador de vidro e centrifugado (5.000 rpm por 10 minutos a 4°C). 30 μl de amostras e padrão foram transferidos em microtubos, 500 μl do substrato (H_2O_2 , 10 mM) foi adicionado. Após 1 minuto de incubação, 500 μl do reagente stop foi acrescentado no microtubo. 20 μl de cada tudo foi transferido para uma placa de 96 poços, 180 μl do cromógeno foi adicionado e após 30 minutos foi feita a leitura à 560 nm. Os resultados foram apresentados como U/mg de proteína.

4.8.3. Determinação da atividade da glutaciona peroxidase (GPx)

A atividade da GPx foi avaliada seguindo as instruções de um kit comercialmente disponível (#703102, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI). O PVAT periaórtico dos animais de cada grupo experimental foi homogeneizado em 300 μl de tampão Tris-HCl (50 mM), pH 7,5 contendo EDTA (5 mM), DTT (1 mM) utilizando um homogeneizador de vidro e centrifugado ($10.000 \times g$ por 15 min a 4°C). 20ul de sobrenadante foram adicionados na placa para iniciar a reação. O ensaio avalia a atividade de GPx indiretamente por reação acoplada com glutaciona redutase (GR), que gera NADP^+ . Esta reação é acompanhada por uma diminuição da absorvância medida a 340 nm. A taxa de diminuição da absorvância é diretamente proporcional à atividade GPx de cada amostra e os resultados foram expressos em nmol/min/mg de proteína.

4.9. Avaliação do perfil inflamatório no PVAT

Objetivo: Verificar se o tratamento com etanol induz migração de células inflamatórias para o PVAT e a participação do receptor AT₁ nessa resposta.

4.9.1. Determinação da concentração de MCP-1

A concentração tecidual de MCP-1 foi avaliada por ELISA seguindo as instruções de um kit comercialmente disponível (RAB0058, Sigma-Aldrich, St. Louis, IL, EUA). O PVAT periaórtico dos animais de cada grupo experimental foi homogeneizado em tampão de lise utilizando um homogeneizador de vidro e posteriormente diluído 5 vezes. 100 µl de amostras e padrão foram transferidos para uma placa de 96 poços, após 150 minutos de incubação, cada poço foi lavado por 4 vezes com 300 µl de tampão de lavagem. Em seguida, 100 µl de anticorpo foi adicionado aos poços, após 1 hora de incubação a placa foi novamente lavada por 4 vezes como descrito anteriormente. 100 µl de estreptavidina foi adicionada aos poços, após 45 minutos de incubação os poços foram novamente lavados e 100 µl do tampão colorimétrico tetrametilbenzidina (TMB) foi adicionado e a placa foi incubada por 30 min no escuro. Por fim, foi adicionado 50 µl da solução de parada e a placa foi lida. A concentração de MCP-1 foi determinada colorimetricamente a 450 nm. Os resultados foram apresentados como pg/mg de proteína.

4.9.2. Determinação da concentração de RANTES

A concentração tecidual de RANTES foi avaliada por ELISA seguindo as instruções de um kit comercialmente disponível (MBS704646, MyBioSource, San Diego, California, EUA). O PVAT periaórtico dos animais de cada grupo experimental foi homogeneizado em PBS, pH 7,4 (20 mmol/l de KH₂PO₄, 1 mmol/l de EGTA e 150 mmol/l de sacarose) utilizando um homogeneizador de vidro e centrifugado (5000 x g, 5 min, 4°C) e posteriormente diluído 5 vezes. 100 µl de amostras e padrão foram transferidos para uma placa de 96 poços, após 2 horas de incubação à 37°C, o líquido de cada poço foi descartado e

100 µl de anticorpo foi pipetado, após 1 hora de incubação à 37°C, cada poço foi lavado por 3 vezes com 200 µl de tampão de lavagem. 100 µl de avidina-HRP foi adicionado aos poços, após 1 hora de incubação, os poços foram lavados por 5 vezes. Em seguida, 90 µl de tampão colorimétrico tetrametilbenzidina (TMB) foi adicionado e deixado 30 minutos de incubação protegido da luz. Por fim foi adicionado o volume de 50 µl da solução de parada nos poços e a placa foi lida. A concentração de RANTES foi determinada a 450 nm. Os resultados foram expressos em ng/mg de proteína.

4.9.3. Determinação da atividade da n-acetilglicosaminidase (NAG)

A quantificação do acúmulo/ativação de macrófagos tecidual foi avaliada pela determinação da atividade da enzima NAG. 50 miligramas de PVAT periaórtico dos animais de cada grupo experimental foram homogeneizados em tampão EDTA-fosfato de sódio (NaCl 0,1 mol/l; NaPO₄ 0,02 mol/l; Na₂EDTA 0,015 mol/l, pH 4,7) e centrifugados (9.600 × g, 10 min, 4°C). O sedimento foi ressuscitado em solução de lise hipotônica (NaCl 0,2% e NaCl 1,6% com glicose 5%) e centrifugado novamente. O sobrenadante foi descartado e o sedimento solubilizado em salina triton 0,1%. Posteriormente, as suspensões foram centrifugadas (3.000 × g, 15 min, 4°C) e o sobrenadante foi utilizado para a medida da atividade da NAG. O ensaio foi realizado pela adição de 100 µl das amostras e 100 µl de substrato 4-nitrofenil N-acetil-β-D-glicosaminida (#N9376, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), que foram incubados (37°C por 10 min). Em seguida, 100 µl de tampão glicina (0,2 mol/l) foram adicionados à microplaca. A leitura foi realizada em comprimento de onda de 405nm em espectrofotômetro. A atividade da NAG foi expressa como unidades relativas D.O./100 mg tecido.

4.9.4. Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO)

A quantificação do acúmulo/ativação de neutrófilos tecidual foi avaliada pela determinação da atividade da enzima MPO. 50 miligramas de PVAT periaórtico dos animais de cada grupo experimental foram homogeneizados em tampão EDTA-fosfato de sódio

(NaCl 0,1 mol/l; NaPO₄ 0,02 mol/l; Na₂EDTA 0,015 mol/l, pH 4,7) e centrifugados (9.600 × g, 10 min, 4°C). O sedimento foi ressuspensionado em solução de lise hipotônica (NaCl 0,2% e NaCl 1,6% com glicose 5%) e centrifugado novamente. O sobrenadante foi descartado e o sedimento solubilizado em 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 3 ciclos de congelamento-descongelamento em nitrogênio líquido. Posteriormente, as suspensões foram centrifugadas (9.600 × g, 15 min, 4°C) e o sobrenadante utilizado para a medida da atividade da MPO. O ensaio foi realizado pela adição de 25 µl das amostras a 25 µl de substrato 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB 1,6 mmol/l, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), que foram incubados (37°C por 5 min). Em seguida, 25 µl de H₂O₂ (0,002%) foram adicionados à microplaca, e novamente incubada (37°C por 5 min). A reação foi paralisada pela adição de 25 µl de H₂SO₄ 4mol/l. A leitura foi realizada em comprimento de onda de 450nm em espectrofotômetro. A atividade da MPO foi expressa como unidades relativas D.O./100 g tecido.

4.9.5. Determinação da concentração de TNF- α

A concentração tecidual de TNF- α foi avaliada por ELISA seguindo as instruções de um kit comercialmente disponível (RAB0480, Sigma-Aldrich, St. Louis, IL, EUA). O PVAT periaórtico dos animais de cada grupo experimental foi homogeneizado em PBS, pH 7,4 (20 mmol/l de KH₂PO₄, 1 mmol/l de EGTA e 150 mmol/l de sacarose) utilizando um homogeneizador de vidro, centrifugado (6.500 x g, 10min, 4°C) e posteriormente diluídas 2 vezes. 100 µl das amostras e padrão foram transferidos para uma placa de 96 poços, após 150 minutos de incubação, cada poço foi lavado por 4 vezes com 300 µl de tampão de lavagem. Em seguida, 100 µl de anticorpo foi adicionado aos poços, após 1 hora de incubação a placa foi novamente lavada por 4 vezes como descrito anteriormente. 100 µl de

estreptavidina foi adicionada aos poços, após 45 minutos de incubação os poços foram novamente lavados e 100 µl do tampão colorimétrico tetrametilbenzidina (TMB) foi adicionado e a placa foi incubada por 30 min no escuro. Por fim, foi adicionado 50 µl da solução de parada e a placa foi lida. A concentração de TNF- α foi determinada colorimetricamente a 450 nm. Os resultados foram apresentados como pg/mg de proteína.

4.9.6. Análise de citometria de fluxo

O PVAT foi seccionado com tesoura cirúrgica e incubado com uma solução de digestão enzimática contendo colagenase IV 40 U/ml (Cat. No. C4-BIO, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e DNase 40 µg/ml (Cat. No. 9003-98-9, Sigma-Aldrich) por 30 min a 37 °C. Em seguida, as amostras foram filtradas usando filtros celulares de 70 e 40 µm. O número de células na suspensão resultante foi contado em um contador automático de células (contador automático de células TC20, BIO-RAD, Hercules, CA, EUA). Um total de $0,5 \times 10^6$ células foram incubadas com os seguintes anticorpos conjugados a fluorocromos para moléculas de superfície: CD45 (PE-Cy7, Cat. No. 202225, BioLegend, San Diego, CA, EUA), RT1B (PerCP, Cat. No. 557016, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EUA), CD11b (APC, Cat. No. 562102, BD Biosciences) e CD68 (FITC, Cat. No. 130102723, Miltenyi Biotec, Cologne, Germany). As células marcadas foram adquiridas no FACSCanto II Cell Analyzer (BD Biosciences). As dispersões foram analisadas usando o software FlowJo™ (BD Biosciences).

4.10. Análise estatística

Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM). Análise de variância de duas vias (*two-way* ANOVA), seguida pelo pós-teste de Bonferroni foram realizados para detectar as diferenças entre os valores em estudo. $P < 0,05$ foi considerado

significativo. Para as análises foi usado o programa GraphPad Prism® 8.0 (San Diego, CA, EUA).

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Efeito do consumo de etanol sobre a evolução temporal da ingestão de líquido e ração dos animais

Inicialmente, a fim de avaliar se o protocolo escolhido de tratamento com o etanol afeta a ingestão de líquido e ração dos animais, foi realizada uma estimativa semanal da ingestão individual através da divisão do peso de ração e volume de líquido consumidos pelo número de animais por caixa. Os grupos tratados com etanol 20% (vol./vol.) apresentaram redução do consumo de líquido e de ração em comparação aos grupos tratados com água (Figura 4A e B).

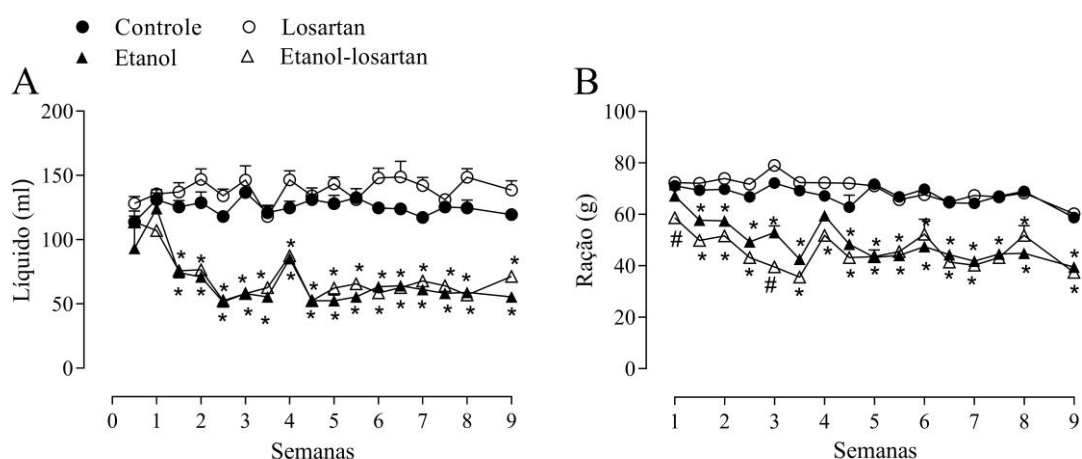


Figura 4. O consumo de etanol reduz a ingestão de líquido e ração em ratos. (A) O consumo líquido (ml) e (B) consumo de ração (g) dos animais foram avaliados durante 9 semanas de tratamento. Os resultados representam a média \pm EPM de $n=8$ animais por grupo. *Comparado aos grupos controle e losartan; #Comparado aos grupos controle, losartan e etanol-losartan ($p<0,05$; *two-way* ANOVA seguida pelo pós-teste de Bonferroni).

5.2. Efeito do consumo de etanol sobre a pressão arterial sistólica, diastólica, média e frequência cardíaca e avaliação da participação dos receptores AT₁ nessa resposta

O consumo crônico de etanol acarreta alterações significativas na função cardíaca e circulatória, figurando como um importante fator de risco no desenvolvimento de doenças cardiovasculares, como por exemplo, a hipertensão arterial [9]. Nesse sentido, a monitoração

não invasiva da pressão arterial demonstrou aumento da pressão arterial sistólica a partir da 5ª semana de tratamento com etanol, resposta que se manteve constante até a 9ª semana. O bloqueio dos receptores AT₁ preveniu essa alteração da pressão arterial (Figura 5A). A monitoração invasiva da pressão arterial confirmou os achados obtidos com o método de pletismografia. Nas 3 primeiras semanas de tratamento, nenhuma alteração da pressão arterial sistólica, diastólica ou média foi encontrada. Entretanto, na 9ª semana de tratamento com etanol, houve aumento da pressão arterial sistólica, diastólica e média e o losartan preveniu tais alterações (Figura 5B-D). A frequência cardíaca não sofreu alterações após o tratamento com etanol por 3 ou 9 semanas (Figura 5E).

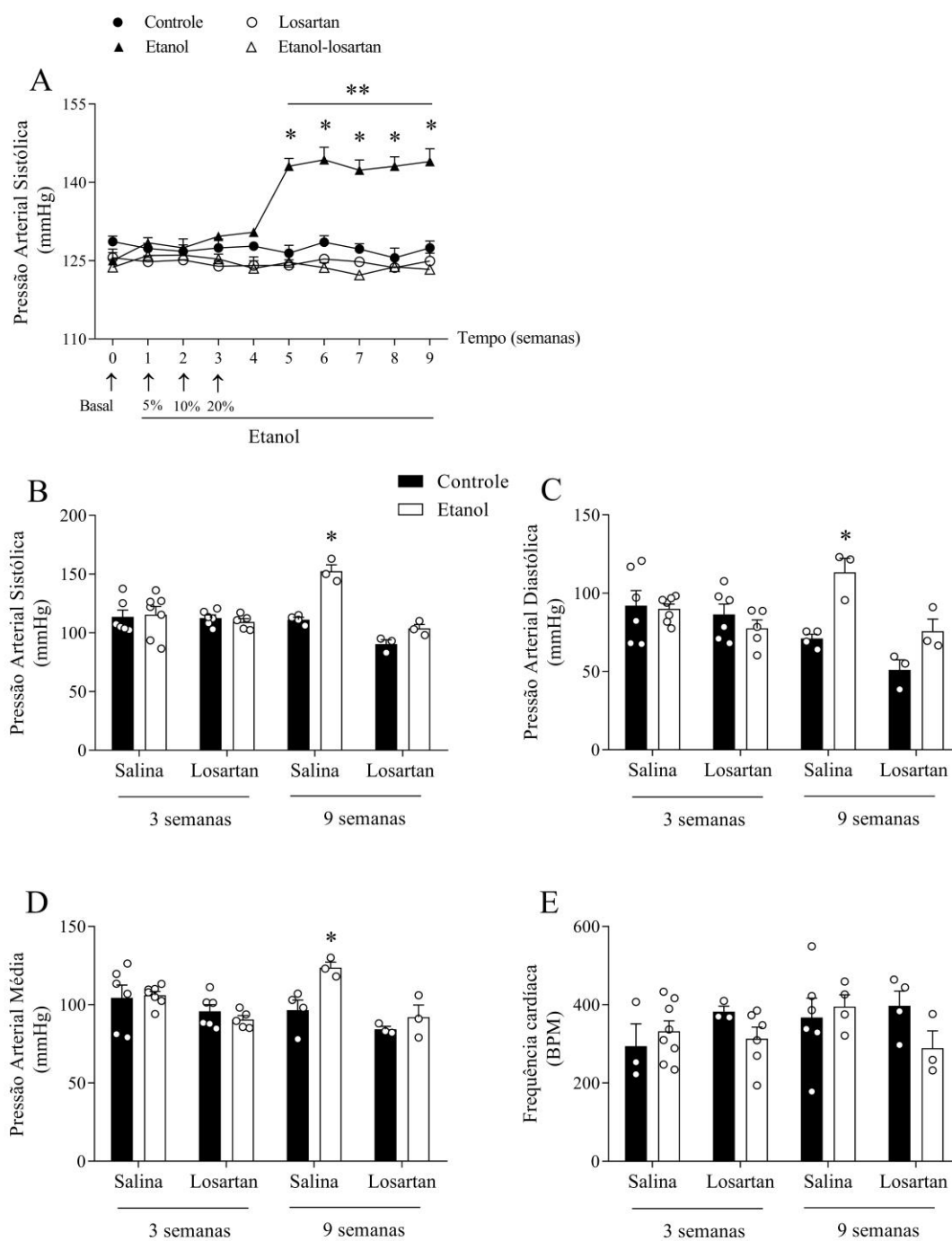


Figura 5. Ativação de receptores AT₁ modula a hipertensão arterial induzida pelo consumo de etanol.

(A) A pressão arterial sistólica foi medida semanalmente por pletismógrafo de manguito de cauda por 9 semanas. Monitoramento invasivo foi usado para determinar pressão arterial (B) sistólica, (C) diastólica e (D) média, bem como (E) frequência cardíaca no final da 3^a e 9^a semanas de tratamento com etanol. Os resultados representam a média ± EPM de n=3-8 animais por grupo. *Comparado aos grupos controle, losartan e etanol-losartan; **Comparado ao grupo etanol antes da 5^a semana (p<0,05; ANOVA two-way seguida de pós-teste

5.3. Estudo funcional de reatividade vascular em aortas torácicas

5.3.1. Efeito do consumo de etanol sobre a resposta contrátil à fenilefrina e serotonina ao término da 3ª semana de tratamento.

Uma vez que na 3ª semana de tratamento com etanol não houve alterações nos níveis pressóricos, investigamos se neste período o etanol prejudica o efeito anti-contrátil do PVAT, permitindo dessa forma avaliar se essa resposta participa da gênese do aumento da pressão arterial. Os anéis aórticos com e sem PVAT foram estimulados com dois diferentes agentes contráteis, a fenilefrina ou a serotonina. Primeiramente, verificamos que a retirada do PVAT em aortas com e sem endotélio de animais do grupo controle resultou em aumento de potência e resposta máxima à fenilefrina e serotonina, o que confirma que o PVAT tem uma ação modulatória anti-contrátil no controle do tônus vascular (Figura 6A-D). Entretanto, para ambos os agentes contráteis, o tratamento com etanol induziu perda do efeito anti-contrátil do PVAT em anéis aórticos com endotélio intacto, mas não sem endotélio, sugerindo que essa resposta é dependente do endotélio (Figura 6A e C). Em aortas sem PVAT, a resposta contrátil induzida pela fenilefrina foi aumentada (com endotélio intacto ou desnudado) na 3ª semana de tratamento com etanol (Figura 6A e B). Entretanto, em resposta à serotonina, aortas sem PVAT não sofreram alterações na resposta contrátil em animais do grupo etanol (Figura 6C e D).

Na tabela 1 estão representados os valores de E_{max} e pD_2 para fenilefrina e serotonina em aortas PVAT(+) e PVAT(-) com Endo(+) e sem Endo(-) endotélio de ratos do grupo controle e etanol ao término da 3ª semana do tratamento.

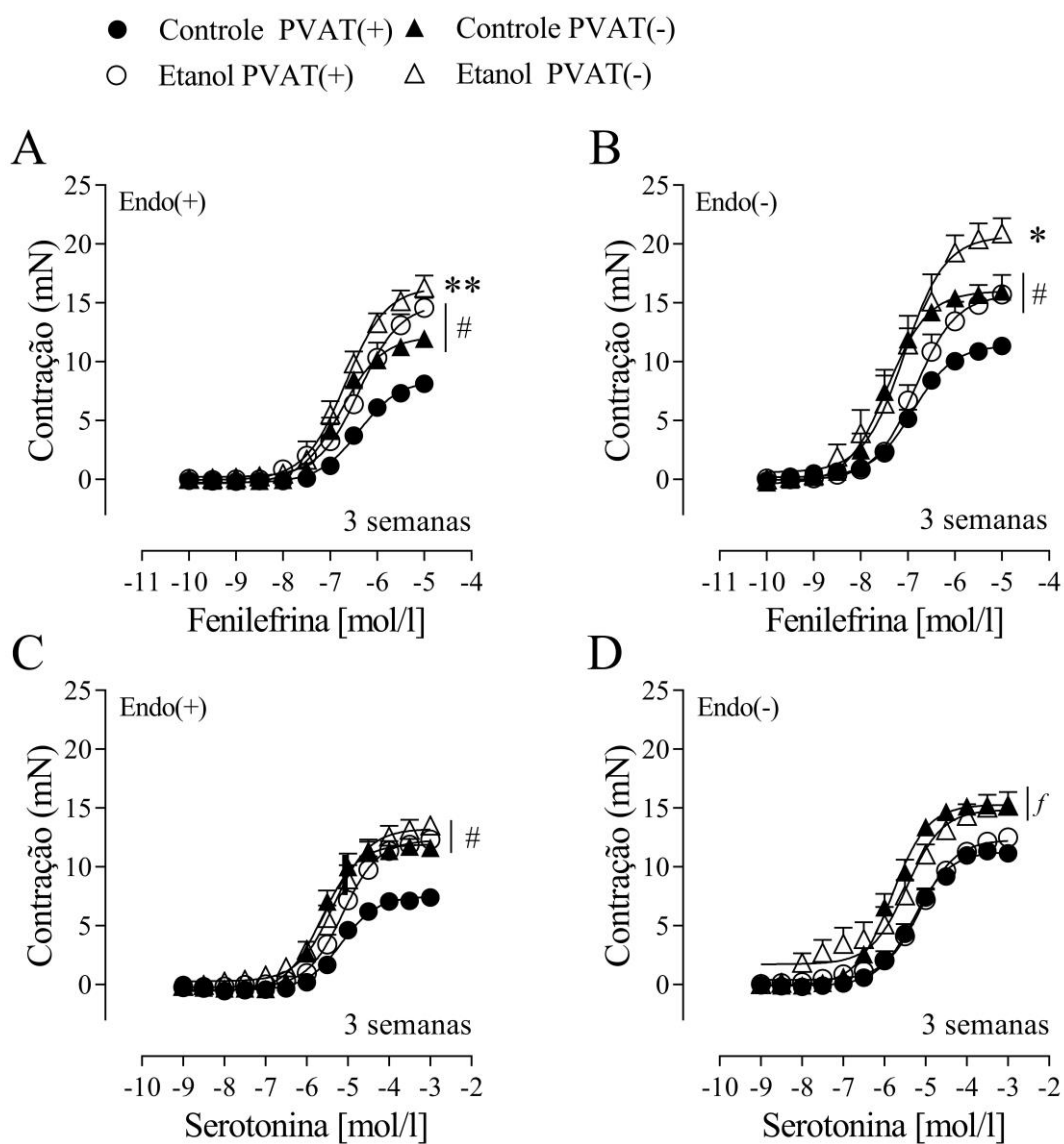


Figura 6. O consumo de etanol promove disfunção do PVAT periaórtico e compromete a função vascular após 3 semanas de tratamento. Curvas concentração-resposta para fenilefrina (A e B) e serotonina (C e D) foram obtidas na 3ª semana de tratamento com etanol. Os resultados representam a média \pm EPM de $n=5-8$ animais por grupo. #Comparado ao grupo controle PVAT(+); **Comparado aos grupos controle PVAT(-) e controle PVAT(+); *Comparado aos grupos controle PVAT(-), controle PVAT(+) e etanol PVAT(+); ^fComparado aos grupos controle PVAT(+) e etanol PVAT(+) ($p<0,05$; ANOVA two-way seguida do pós-teste de Bonferroni).

Tabela 1. Valores de E_{max} (mN) e pD_2 de fenilefrina e serotonina em aorta PVAT(+) e PVAT(-), Endo(+) ou Endo(-) referentes à 3ª semana de tratamento com etanol.

3ª semana de tratamento crônico de etanol				
Fenilefrina	PVAT (-) / Endo (+)		PVAT (+) / Endo (+)	
	E_{max} (mN)	pD_2	E_{max} (mN)	pD_2
Controle	11,9 ± 0,4 (8) ^a	6,8 ± 0,1	8,1 ± 0,5 (8)	6,4 ± 0,1 ^b
Etanol	16,3 ± 1,0 (8) ^{ab}	6,7 ± 0,1	14,6 ± 0,9 (8) ^a	6,4 ± 0,1 ^b
Serotonina				
Grupos	E_{max} (mN)	pD_2	E_{max} (mN)	pD_2
Controle	11,6 ± 0,5 (8) ^a	5,6 ± 0,1 ^{acd}	7,4 ± 0,5 (8)	5,1 ± 0,1
Etanol	13,5 ± 0,8 (8) ^a	5,3 ± 0,1 ^{ad}	12,3 ± 0,7 (8) ^a	5,1 ± 0,1
Fenilefrina				
Fenilefrina	PVAT (-) / Endo (-)		PVAT (+) / Endo (-)	
	E_{max} (mN)	pD_2	E_{max} (mN)	pD_2
Controle	15,9 ± 0,5 (5) ^a	7,4 ± 0,1	11,3 ± 0,4 (8)	6,9 ± 0,1 ^{bc}
Etanol	20,9 ± 1,3 (6) ^{abd}	7,1 ± 0,1 ^a	15,7 ± 1,6 (7) ^a	6,8 ± 0,1 ^{bc}
Serotonina				
Grupos	E_{max} (mN)	pD_2	E_{max} (mN)	pD_2
Controle	15,2 ± 0,3 (8) ^{ad}	5,8 ± 0,1 ^a	11,1 ± 0,3 (8)	5,3 ± 0,1
Etanol	15,2 ± 1,2 (8) ^{ad}	5,5 ± 0,1 ^{ab}	12,5 ± 0,7 (8)	5,1 ± 0,1 ^{abc}

Os valores representam a média ± EPM dos diferentes grupos experimentais; os números entre parênteses representam o n de cada grupo experimental; ^aDiferença em relação ao grupo controle PVAT(+); ^bDiferença em relação ao grupo controle PVAT(-); ^cDiferença em relação ao grupo etanol PVAT(-); ^dDiferença em relação etanol PVAT(+) ($p < 0,05$; *two-way* ANOVA seguida pelo pós-teste de Bonferroni).

5.3.2. Efeito do consumo de etanol sobre a resposta contrátil à fenilefrina ao término da 9ª semana de tratamento.

Como demonstrado anteriormente, na 9ª semana de tratamento com etanol houve aumento da pressão arterial sistólica, diastólica e média. Portanto investigamos se neste período o PVAT continua prejudicado em decorrência do consumo crônico de etanol, permitindo dessa forma avaliar se essa resposta participa da manutenção do aumento da pressão arterial. O PVAT reduziu a potência e atenuou a contração máxima induzida pela fenilefrina nos anéis aórticos (com ou sem endotélio) dos animais do grupo controle. De maneira similar aos resultados dos animais tratados por 3 semanas, encontramos disfunção do PVAT induzida por etanol de maneira dependente do endotélio nas artérias dos animais tratados por 9 semanas, além de observar aumento da potência da fenilefrina. Em aortas sem PVAT, também observamos aumento da potência e da resposta máxima à fenilefrina (com endotélio intacto ou desnudado) (Figura 7A-B).

Na tabela 2 estão representados os valores de E_{max} e pD_2 para fenilefrina em aortas PVAT(+) e PVAT(-) com Endo(+) e sem Endo(-) endotélio de ratos do grupo controle e etanol ao término da 9ª semana do tratamento.

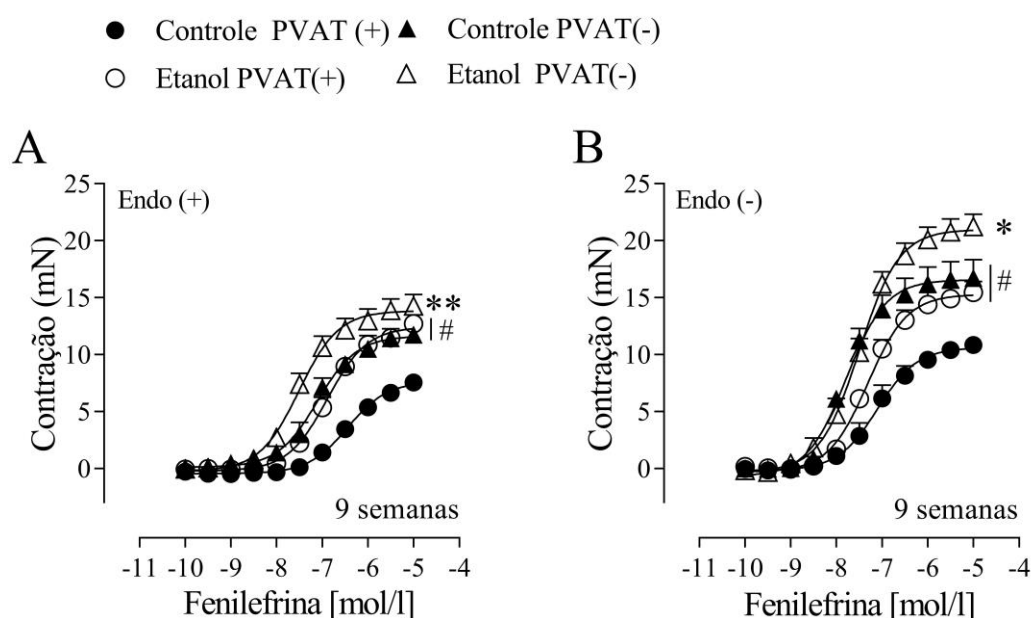


Figura 7. O consumo de etanol promove disfunção do PVAT periaórtico e compromete a função vascular após 9 semanas de tratamento. Curvas concentração-resposta para fenilefrina (A e B) foram obtidas na 9ª semana de tratamento com etanol. Os resultados representam a média \pm EPM de $n=5-8$ animais por grupo. #Comparado ao grupo controle PVAT(+); **Comparado aos grupos controle PVAT(-) e controle PVAT(+); *Comparado aos grupos controle PVAT(-), controle PVAT(+), e etanol PVAT(+). ($p < 0,05$; ANOVA two-way seguida do pós-teste de Bonferroni).

Tabela 2. Valores de E_{max} (mN) e pD_2 de fenilefrina em aorta PVAT(+) e PVAT(-), Endo(+) ou Endo(-) referentes à 9ª semana de tratamento com etanol.

Fenilefrina	9ª semana de tratamento crônico de etanol			
	PVAT (-) / Endo (+)		PVAT (+) / Endo (+)	
Grupos	E_{max} (mN)	pD_2	E_{max} (mN)	pD_2
Controle	$11,7 \pm 0,4$ (5) ^a	$7,1 \pm 0,1$ ^a	$8,1 \pm 0,5$ (8)	$6,4 \pm 0,1$
Etanol	$14,3 \pm 1,0$ (8) ^{ab}	$7,5 \pm 0,1$ ^{ab}	$12,7 \pm 0,7$ (5) ^a	$6,9 \pm 0,1$ ^{abd}

Fenilefrina	9ª semana de tratamento crônico de etanol			
	PVAT (-) / Endo (-)		PVAT (+) / Endo (-)	
Grupos	E_{max} (mN)	pD_2	E_{max} (mN)	pD_2
Controle	$16,7 \pm 1,5$ (5) ^a	$7,8 \pm 0,1$ ^a	$10,8 \pm 0,8$ (7)	$7,1 \pm 0,1$
Etanol	$21 \pm 1,1$ (8) ^{abd}	$7,5 \pm 0,1$ ^{abd}	$15,5 \pm 1,0$ (5) ^a	$7,3 \pm 0,1$ ^{ab}

Os valores representam a média \pm EPM dos diferentes grupos experimentais; os números entre parênteses representam o n de cada grupo experimental; ^aDiferença em relação ao grupo controle PVAT(+); ^bDiferença em relação ao grupo controle PVAT(-); ^cDiferença em relação ao grupo etanol PVAT(-); ^dDiferença em relação etanol PVAT(+) ($p < 0,05$; *two-way* ANOVA seguida pelo pós-teste de Bonferroni).

5.3.3. Avaliação da participação do receptor AT₁ no efeito do consumo de etanol sobre a resposta anti-contrátil do PVAT

A perda do efeito anti-contrátil do PVAT foi encontrada tanto na 3^a quanto na 9^a semana de tratamento com etanol. As investigações dos mecanismos envolvidos nessa resposta foram realizadas ao final da 3^a semana. Esse período de tratamento escolhido foi em virtude do aumento da pressão arterial ainda não ter se instalado, dessa forma é possível avaliar quais os mecanismos que precedem a hipertensão arterial induzida pelo etanol.

O SRAA tem relevante participação nas alterações cardiovasculares induzidas pelo consumo de etanol [27]. Portanto, avaliamos a participação dos receptores AT₁ no prejuízo da função do PVAT periaórtico demonstrado anteriormente. O losartan preveniu os efeitos do etanol em aumentar a contração vascular induzida pela fenilefrina em anéis aórticos sem PVAT, bem como a perda do efeito anti-contrátil do PVAT, sugerindo um papel para os receptores AT₁ em tais respostas (Figura 8A e B). Confirmando esses achados, o losartan também preveniu a disfunção do PVAT em anéis aórticos estimulados com serotonina, entretanto nenhuma alteração foi encontrada em vasos sem o PVAT. (Figura 8C e D). Vale ressaltar que esses experimentos foram realizados apenas em preparações aórticas na presença do endotélio, uma vez que os efeitos prejudiciais do PVAT anteriormente encontrados eram dependentes dessa camada vascular.

Na tabela 3 estão representados os valores de E_{max} e pD_2 para fenilefrina e serotonina em aortas PVAT(+) e PVAT(-) com Endo(+) endotélio de ratos do grupo controle, etanol, losartan e etanol-losartan ao término da 3^a semana de tratamento.

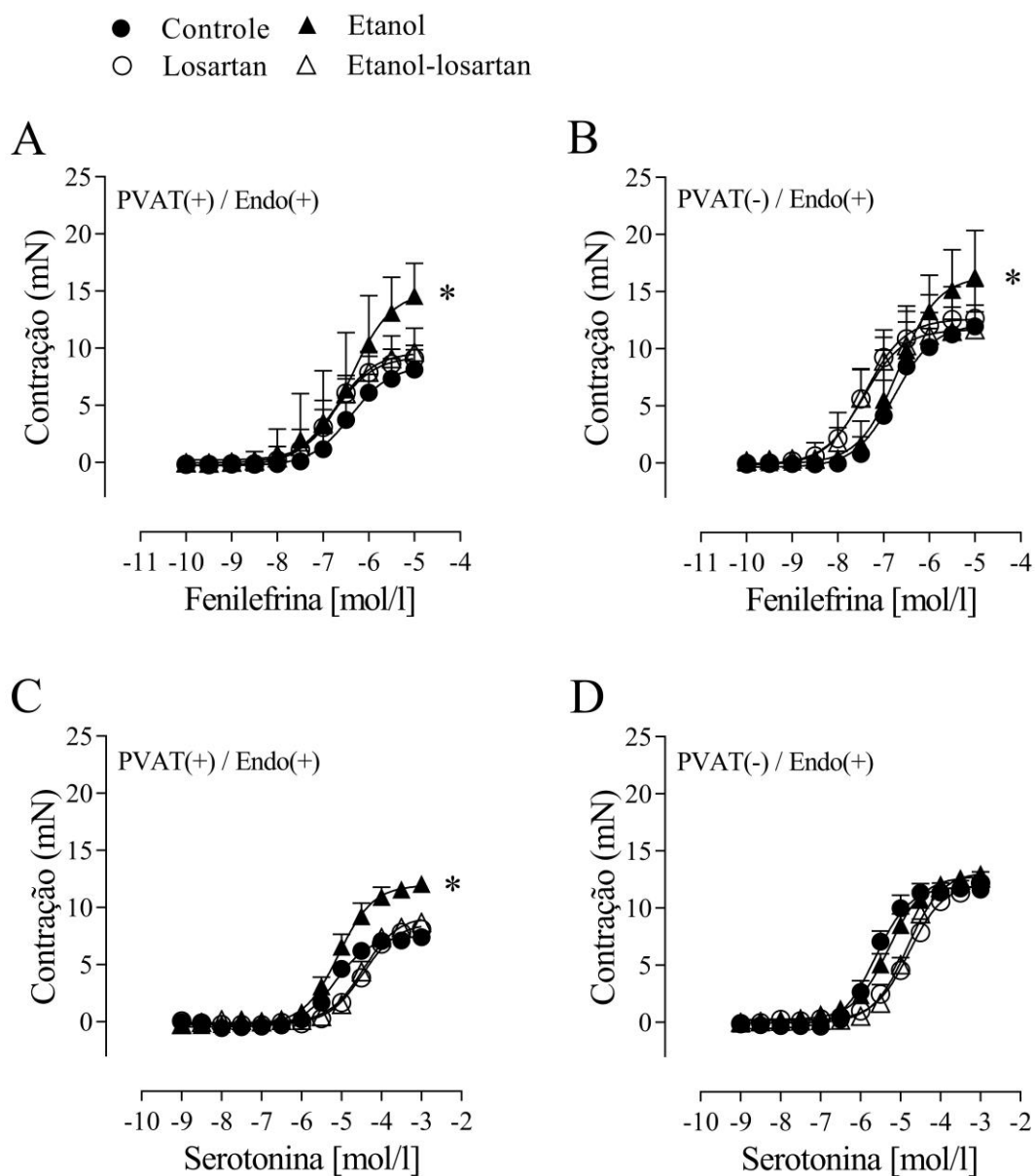


Figura 8. Ativação de receptores AT_1 participa da perda do efeito anti-contrátil do PVAT periaórtico de ratos tratados com etanol. Curvas concentração-resposta para fenilefrina (A e B) e serotonina (C e D) foram obtidas na 3ª semana de tratamento com etanol. Os resultados representam a média \pm EPM de $n=8$ animais por grupo. *Comparado aos grupos controle, losartan e etanol-losartan ($p<0,05$; ANOVA two-way seguida do pós-teste de Bonferroni).

Tabela 3. Valores de E_{max} (mN) e pD_2 de fenilefrina e serotonina em aorta PVAT (+), PVAT (-) e Endo(+) referentes ao tratamento de losartan ao término da 3ª semana de tratamento.

Fenilefrina	PVAT (+) / Endo (+)		PVAT (-) / Endo (+)	
	E_{max} (mN)	pD_2	E_{max} (mN)	pD_2
Controle	8,1 ± 0,5 (15)	6,4 ± 0,1	11,9 ± 0,4 (8)	6,8 ± 0,1
Etanol	14,6 ± 0,9 (11) ^b	6,3 ± 0,1	16,3 ± 1,0 (15) ^b	6,7 ± 0,1
Losartan	9,1 ± 0,3 (15)	6,8 ± 0,1 ^a	12,7 ± 0,8 (14)	7,4 ± 0,1 ^a
Etanol-losartan	9,8 ± 0,5 (16)	6,7 ± 0,1 ^a	11,7 ± 0,8 (8)	7,4 ± 0,1 ^a
Serotonina				
Grupos	E_{max} (mN)	pD_2	E_{max} (mN)	pD_2
Controle	7,4 ± 0,5 (13)	5,1 ± 0,1	11,6 ± 0,5 (10)	5,6 ± 0,1
Etanol	12,1 ± 0,7 (11) ^b	5,1 ± 0,1	12,9 ± 0,6 (13)	5,3 ± 0,1 ^b
Losartan	8,1 ± 0,4 (10)	4,5 ± 0,1 ^a	12,2 ± 1,0 (11)	4,8 ± 0,1 ^a
Etanol-losartan	8,7 ± 0,5 (11)	4,5 ± 0,1 ^a	12,6 ± 0,7 (12)	4,8 ± 0,1 ^a

Os valores representam a média ± EPM dos diferentes grupos experimentais; os números entre parênteses representam o n de cada grupo experimental; ^aDiferença em relação aos grupos controle e etanol; ^bDiferença em relação aos grupos controle, losartan e etanol-losartan ($p < 0,05$; *two-way* ANOVA seguida pelo pós-teste de Bonferroni).

5.4. Avaliação dos mecanismos pelos quais o etanol via receptor AT_1 promove disfunção do PVAT

5.4.1. Efeito do consumo de etanol sobre os fatores relaxantes dependentes do endotélio derivados do PVAT

5.4.1.1. Efeito do consumo de etanol sobre a ação modulatória vascular da Ang (1-7) e avaliação da participação do receptor AT_1 nessa resposta

Uma vez que nossos resultados demonstraram que o efeito do etanol sobre a ação modulatória do PVAT é dependente do endotélio, focamos em investigar os fatores vasorelaxantes liberados pelo PVAT que exercem seus efeitos por um mecanismo associado

à túnica íntima. A angiotensina 1-7 é liberada pelo PVAT e promove seus efeitos através da ativação dos receptores *Mas*, os quais são expressos em células endoteliais. Suas ações incluem a ativação da eNOS que por conseguinte, ocorre liberação de NO para a promoção do vasorelaxamento [77, 78]. O A779, antagonista seletivo dos receptores *Mas*, foi utilizado para avaliar a possível participação da angiotensina (1-7) nos efeitos produzidos pelo etanol sobre o PVAT. O A779 aumentou a resposta máxima de contração e a potência da fenilefrina em anéis aórticos com endotélio intacto na presença do PVAT de ratos do grupo controle, em comparação com artérias não incubadas com o antagonista (Figura 9A), confirmando que a angiotensina (1-7) participa do efeito anti-contrátil fisiológico do PVAT. Entretanto, o A779 não alterou a contração induzida pela fenilefrina de aortas de ratos tratados com etanol, em comparação com anéis não incubados com o antagonista (Figura 9A). Esse dado sugere uma disfunção dos efeitos da angiotensina (1-7) em decorrência do consumo de etanol.

Por outro lado, em anéis aórticos com PVAT e endotélio intacto de animais do grupo etanol tratados com losartan, o A779 aumentou a resposta máxima de contração e a potência da fenilefrina, mantendo um perfil de contração similar aos das aortas quando incubadas com o antagonista de animais que não receberam etanol (Figura 9D). Esse resultado sugere que o receptor AT₁ pode estar associado com os efeitos negativos da angiotensina (1-7) em decorrência do tratamento com etanol, uma vez que o losartan preveniu esse efeito.

O A779 não afetou a contração induzida pela fenilefrina em anéis de aorta na ausência do PVAT ou na ausência do endotélio de ratos do grupo controle, losartan, etanol e etanol-losartan, demonstrando o efeito dependente do endotélio da angiotensina (1-7) advindo do PVAT (Figura 9B, C, E e F).

Na tabela 4 estão representados os valores de E_{max} e pD₂ para fenilefrina em aortas PVAT(+)/Endo(+), PVAT(+)/Endo(-) e PVAT(-)/Endo(+) de ratos do grupo controle, etanol, losartan e etanol-losartan na presença ou ausência do A779.

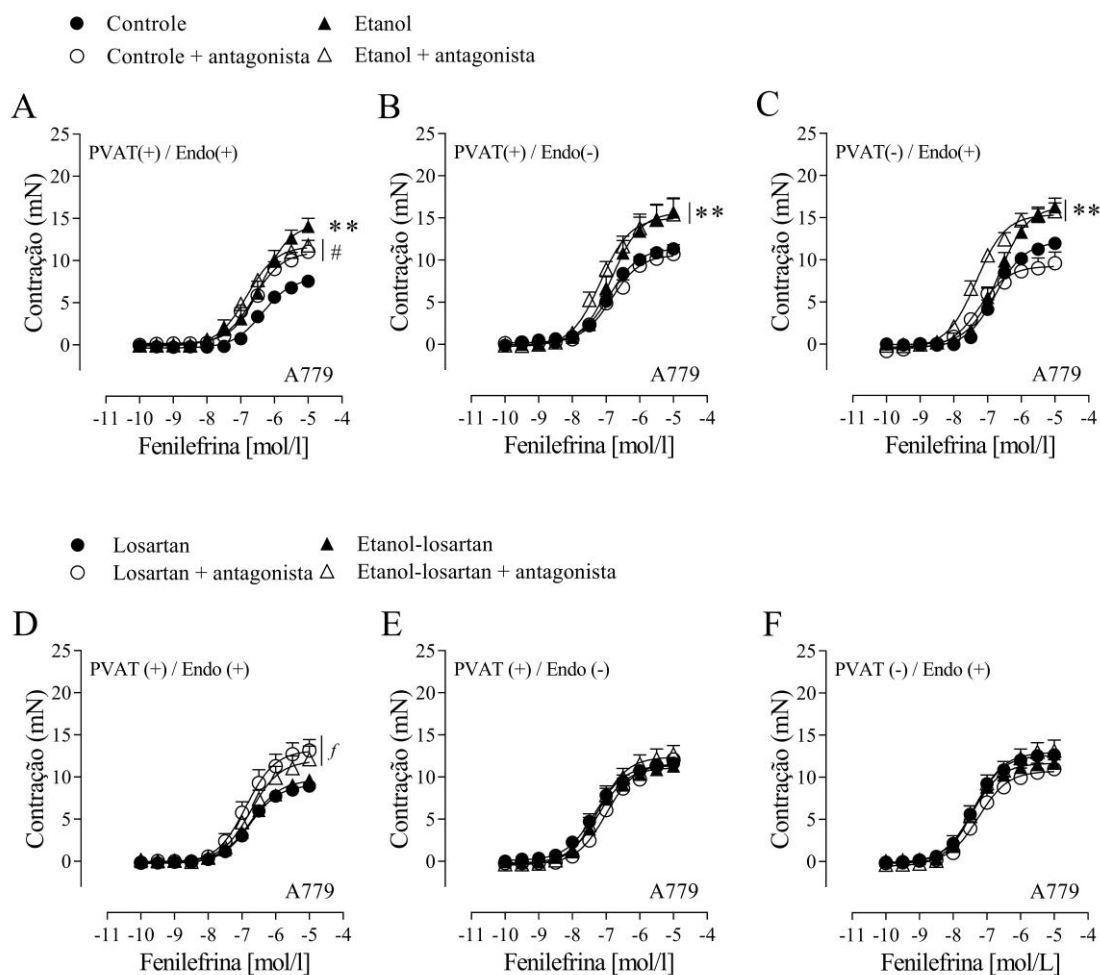


Figura 9. Ativação de receptores AT_1 prejudica a função da angiotensina (1-7) do PVAT periaórtico de ratos tratados com etanol. Curvas concentração-resposta para fenilefrina foram obtidas na presença ou ausência do A779 (1 μ mol/l; A-F). Os resultados representam a média \pm EPM de $n=5-8$ animais por grupo. **Comparado aos grupos controle e controle + antagonista; #Comparado ao grupo controle; *f*Comparado aos grupos losartan e etanol-losartan ($p<0,05$; ANOVA two-way seguida do pós-teste de Bonferroni).

Tabela 4. Valores de E_{max} (mN) e pD_2 de fenilefrina em aortas PVAT(+)/Endo(+), PVAT(+)/Endo(-) e PVAT(-)/Endo(+) na presença do A779 ao término da 3ª semana de tratamento

	PVAT (+) / Endo (+)			
	Ausência do antagonista		A779 (1 μ mol/l)	
	E_{max} (mN)	pD_2	E_{max} (mN)	pD_2
Controle	7,6 \pm 0,2 (13)	6,4 \pm 0,1	11,0 \pm 1,4 (5) ^b	6,6 \pm 0,1 ^b
Etanol	14,1 \pm 0,9 (12) ^{ac}	6,4 \pm 0,1	11,8 \pm 0,6 (8) ^a	6,8 \pm 0,1 ^{bd}
Losartan	8,9 \pm 0,3 (14)	6,7 \pm 0,1	13,2 \pm 1,3 (7) ^c	6,9 \pm 0,1 ^c
Etanol-losartan	9,6 \pm 0,5 (16)	6,7 \pm 0,1	12,1 \pm 1,5 (5) ^c	6,8 \pm 0,1
	PVAT (+) / Endo (-)			
	Ausência do antagonista		A779 (1 μ mol/l)	
	E_{max} (mN)	pD_2	E_{max} (mN)	pD_2
Controle	11,3 \pm 0,4 (9)	6,9 \pm 0,6	10,7 \pm 1,1 (5)	6,8 \pm 0,1
Etanol	15,7 \pm 1,7 (12) ^{acd}	6,8 \pm 0,1	15,4 \pm 1,9 (6) ^{acd}	7,2 \pm 0,1 ^{bd}
Losartan	11,7 \pm 0,6 (9)	7,3 \pm 0,1	12,1 \pm 0,5 (8)	6,9 \pm 0,1 ^c
Etanol-losartan	11,3 \pm 0,7 (9)	7,2 \pm 0,1	12,7 \pm 1,1 (9)	7,0 \pm 0,1
	PVAT (-) / Endo (+)			
	Ausência do antagonista		A779 (1 μ mol/l)	
	E_{max} (mN)	pD_2	E_{max} (mN)	pD_2
Controle	11,9 \pm 0,4 (8)	6,8 \pm 0,1	9,6 \pm 1,3 (8)	7,2 \pm 0,1 ^b
Etanol	16,3 \pm 1,1 (15) ^{acd}	6,7 \pm 0,1	15,8 \pm 0,7 (5) ^d	7,3 \pm 0,1 ^b
Losartan	12,7 \pm 0,8 (14)	7,4 \pm 0,1	10,9 \pm 1,1 (7)	7,3 \pm 0,1
Etanol-losartan	11,7 \pm 0,8 (8)	7,4 \pm 0,1	13,1 \pm 1,3 (8)	7,4 \pm 0,1

Os valores representam a média \pm EPM dos diferentes grupos experimentais; os números entre parênteses representam o n de cada grupo experimental; ^aDiferença em relação ao grupo controle; ^bDiferença em relação aos grupos controle e etanol; ^cDiferença em relação aos grupos losartan e etanol-losartan; ^dDiferença em relação ao grupo controle + antagonista ($p < 0,05$; *two-way* ANOVA seguida pelo pós-teste de Bonferroni).

5.4.1.2. Efeito do consumo de etanol sobre as concentrações da adiponectina e leptina e avaliação da participação do receptor AT₁ nessa resposta

Duas das principais adipocinas liberadas pelo PVAT tem seus efeitos de vasorelaxamento de maneira dependentes do endotélio. A adiponectina e a leptina ativam seus respectivos receptores no endotélio e promovem a ativação da eNOS através de uma via envolvendo AMPK e Akt [84]. Dessa forma, avaliamos se o consumo de etanol poderia ter prejudicado a produção dessas adipocinas no PVAT. Observamos níveis diminuídos de adiponectina no PVAT de ratos tratados com etanol e o bloqueio dos receptores AT₁ com o losartan preveniu esta resposta (Figura 10A). Por outro lado, o tratamento com etanol não afetou os níveis de leptina no PVAT (Figura 10B).

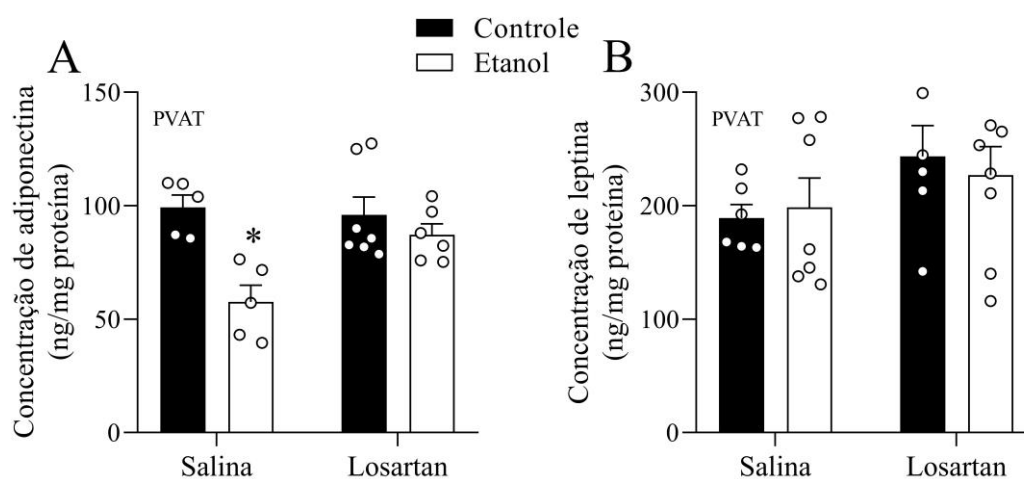


Figura 10. Ativação de receptores AT₁ reduz concentração de adiponectina do PVAT periaórtico de ratos tratados com etanol, mas não altera a concentração de leptina. Concentração de adiponectina (A) e leptina (B) em PVAT foram determinados por ELISA. Os resultados representam a média \pm EPM de n=5-7 animais por grupo. *Comparado aos grupos controle, losartan e etanol-losartan ($p < 0,05$; ANOVA two-way seguida do pós-teste de Bonferroni).

5.4.1.3. Efeito do consumo de etanol sobre a ação modulatória vascular e concentração indireta da PGI₂ e avaliação da participação do receptor AT₁ nessa resposta

Em seguida, avaliamos a participação da PGI₂ na disfunção do PVAT induzida pelo etanol, uma prostaglandina liberada pelo PVAT que contribui diretamente para a proteção vascular contra disfunção endotelial e promove efeitos vasodilatadores pela ativação dos

receptores IP [113]. Dessa forma, ensaios funcionais foram realizados na presença de RO1138452, um antagonista dos receptores IP. O RO1138452 não afetou a contração induzida pela fenilefrina em anéis aórticos com endotélio intacto ou desnudado com PVAT de ratos do grupo controle ou tratados com etanol (Figura 11A e B). Além disso, não foram detectadas alterações na concentração de 6-ceto-PGF 1α , um metabólito estável da PGI 2 , em PVAT após tratamento com etanol (Figura 11C). Esses dados sugerem ausência da participação da PGI 2 na perda do efeito anti-contrátil do PVAT induzida pelo etanol.

Na tabela 5 estão representados os valores de E_{max} e pD_2 para fenilefrina em aortas PVAT(+)/Endo(+), PVAT(+)/Endo(-) de ratos do grupo controle e etanol na presença ou ausência do RO1138452.

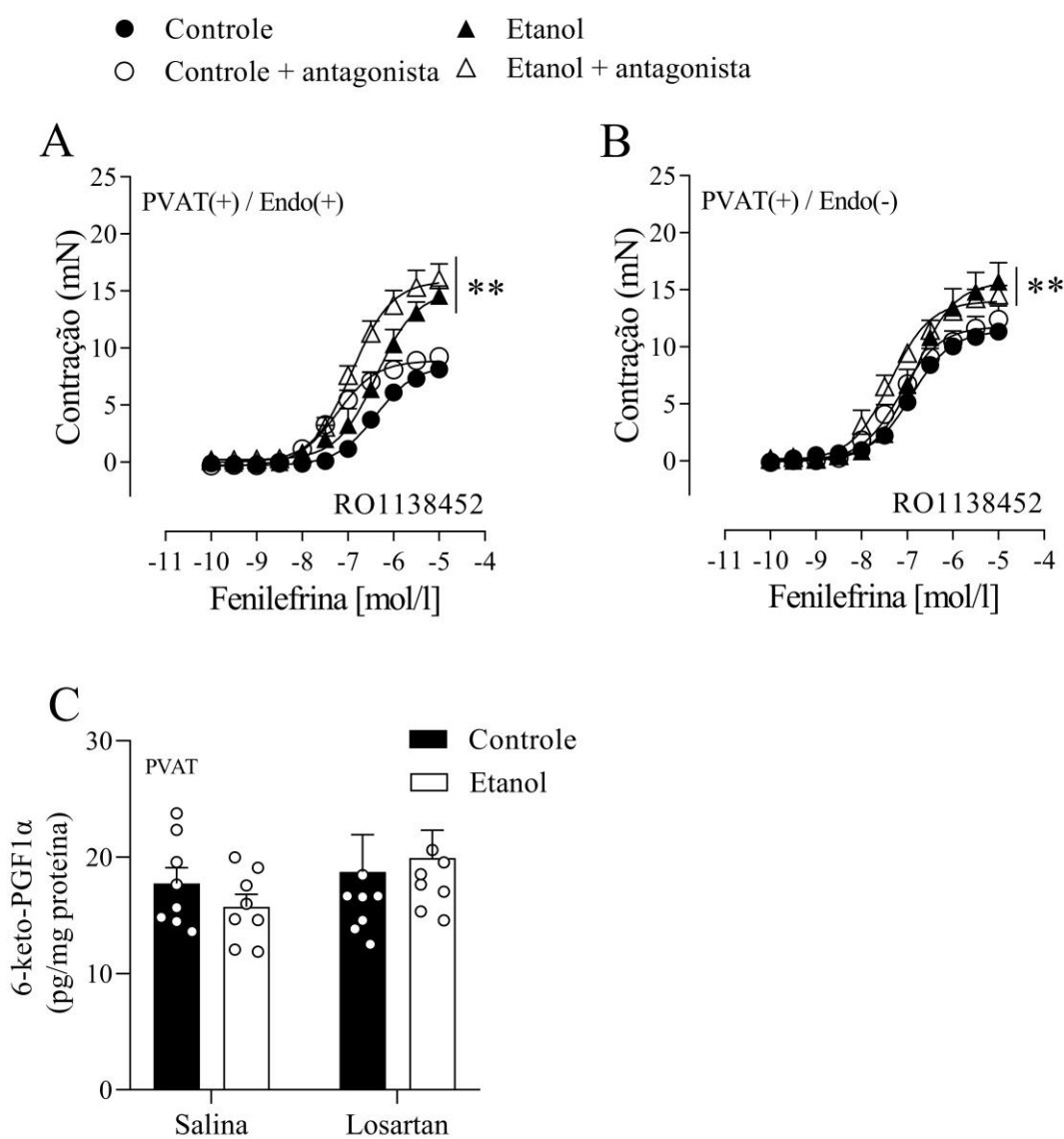


Figura 11. O consumo de etanol não altera a ação modulatória vascular e a concentração indireta do PGI₂ no PVAT periaórtico. Curvas concentração-resposta para fenilefrina foram obtidas na presença ou ausência do RO1138452 (1 μ mol/l, A e B). Concentração de 6-keto-PGF1 α (metabólico estável da PGI₂) foi determinado por ELISA (C). Os resultados representam a média \pm EPM de n=7-8 animais por grupo. **Comparado aos grupos controle e controle + antagonista (p<0,05; ANOVA two-way seguida do pós-teste de Bonferroni).

Tabela 5. Valores de E_{max} (mN) e pD_2 de fenilefrina em aortas PVAT(+)/Endo(+), PVAT(+)/Endo(-) na presença do RO1138452 ao término da 3ª semana de tratamento

	PVAT (+) / Endo (+)			
	Ausência do antagonista		RO1138452 (1 μ mol/l)	
	E_{max} (mN)	pD_2	E_{max} (mN)	pD_2
Controle	8,1 \pm 0,5 (15)	6,4 \pm 0,1	9,2 \pm 0,6 (6)	7,2 \pm 0,1 ^b
Etanol	14,6 \pm 0,9 (11) ^a	6,4 \pm 0,1	15,9 \pm 1,4 (7) ^a	6,9 \pm 0,1 ^b

	PVAT (+) / Endo (-)			
	Ausência do antagonista		RO1138452 (1 μ mol/l)	
	E_{max} (mN)	pD_2	E_{max} (mN)	pD_2
Controle	11,3 \pm 0,4 (9)	6,9 \pm 0,1	12,4 \pm 1,2 (8)	7,1 \pm 0,1 ^b
Etanol	15,7 \pm 1,7 (12) ^a	6,8 \pm 0,1	15,7 \pm 0,6 (6) ^a	7,3 \pm 0,1 ^b

Os valores representam a média \pm EPM dos diferentes grupos experimentais; os números entre parênteses representam o n de cada grupo experimental; ^aDiferença em relação ao grupo controle e controle + inibidor ; ^bDiferença em relação ao grupo controle e etanol ($p < 0,05$; *two-way* ANOVA seguida pelo pós-teste de Bonferroni).

5.4.1.4. Efeito do consumo de etanol sobre a ação modulatória vascular e concentração do NO

5.4.1.4.1. Determinação da concentração de nitrato/nitrito (NOx) e quantificação dos níveis de NO *in situ*

A angiotensina (1-7) e a adiponectina atuam através da liberação endotelial de NO [84]. Uma vez que a função da angiotensina (1-7) foi prejudicada e os níveis da adiponectina foram reduzidas, optamos por investigar a seguir, se o consumo de etanol influencia os níveis vasculares de NO. Nenhuma alteração na intensidade de fluorescência do DAF-2DA na aorta torácica ou PVAT foi detectada entre os grupos (Figura 12A-C). Além disso, o tratamento com etanol não alterou o teor de NOx no PVAT, confirmando que o consumo de etanol não afetou os níveis de NO no PVAT ou na túnica média (Figura 12D).

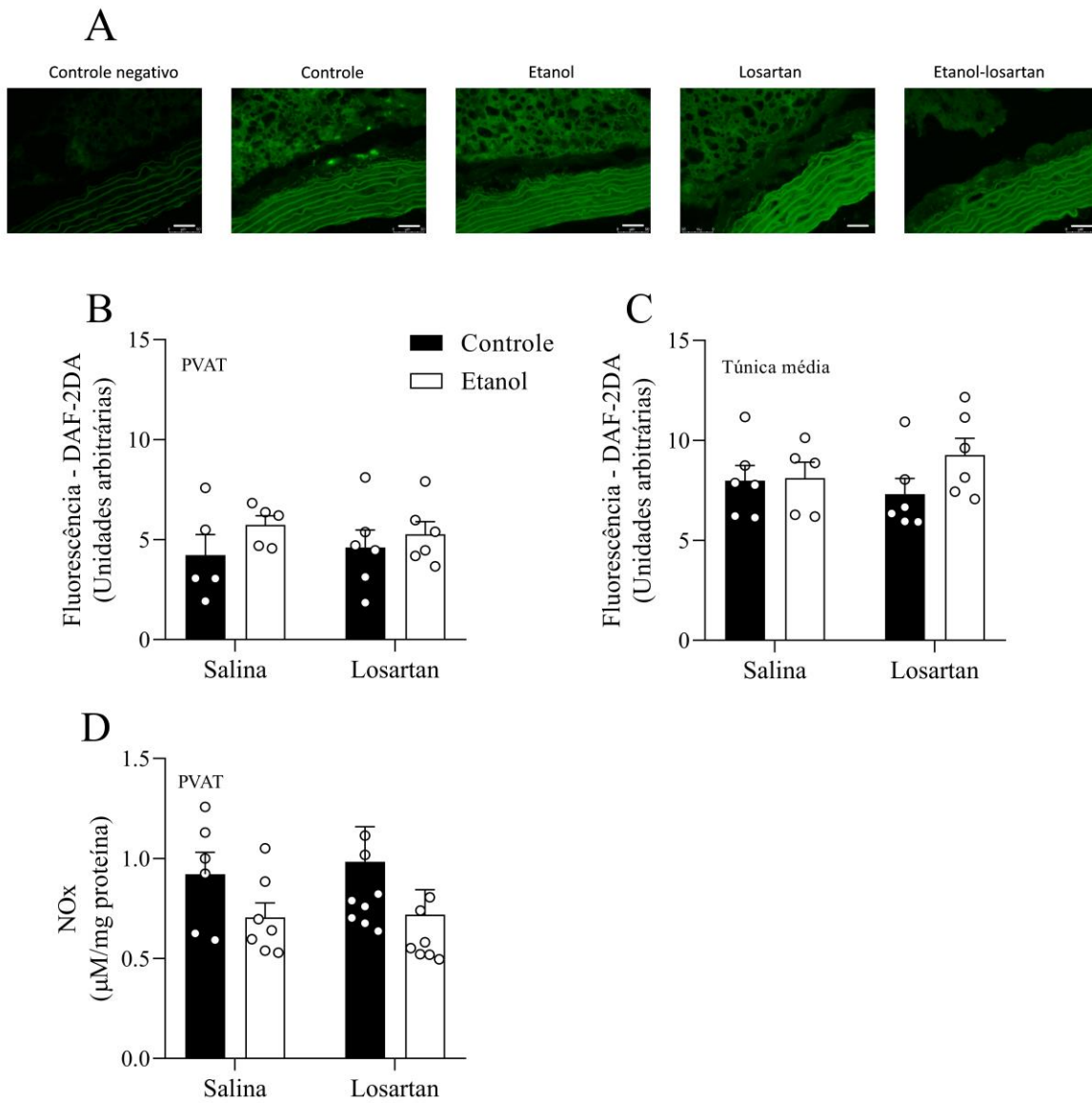


Figura 12. O consumo de etanol não altera a concentração de NO no PVAT periaórtico e na túnica média. Visualização *in situ* da geração de NOx pela sonda fluorescente DAF-2DA (A). Os gráficos de barras representam a quantificação de fluorescência para DAF-2DA determinada em secções transversais do PVAT (B) e da túnica média das paredes da aorta (C). Concentração de NOx em PVAT foi determinada por kit colorimétrico (D). Os resultados representam a média \pm EPM de n=5-8 animais por grupo.

5.4.1.4.2. Efeito do consumo de etanol sobre ação modulatória vascular do NO

A fim de avaliar a resposta funcional do consumo de etanol sobre a via nitrérgica, utilizamos o L-NAME, um inibidor não seletivo das isoformas da enzima NOS. Nossos resultados demonstraram aumento da potência e da contração vascular induzida pela fenilefrina em anéis aórticos na presença do PVAT com endotélio intacto de ratos do grupo controle, em comparação com as contrações obtidas na ausência do inibidor. Por outro lado, o L-NAME não afetou a contração máxima induzida pela fenilefrina nas aortas de ratos tratados com etanol, em comparação com anéis não incubados com o inibidor. No entanto, o L-NAME promoveu um deslocamento para a esquerda das curvas concentração-resposta da fenilefrina nas artérias desses ratos tratados com etanol, demonstrando aumento da potência do agente contrátil (Figura 13A).

Em anéis com endotélio intacto sem PVAT de ratos controle e tratados com etanol, o L-NAME aumentou a contração induzida pela fenilefrina e induziu um deslocamento para a esquerda das curvas concentração-resposta para fenilefrina (Figura 13B). Nas artérias desnudas de endotélio com PVAT, o L-NAME não afetou a contração máxima induzida pela fenilefrina de ratos tratados com etanol, porém promoveu um deslocamento da curva para a esquerda, reforçando a proposta de que a disfunção do PVAT induzida pelo etanol ocorre de maneira dependente do endotélio (Figura 13C).

Na tabela 6 estão representados os valores de E_{max} e pD_2 para fenilefrina em aortas PVAT(+)/Endo(+), PVAT(-)/Endo(+) e PVAT(+)/Endo(-) de ratos do grupo controle e etanol na presença ou ausência do L-NAME.

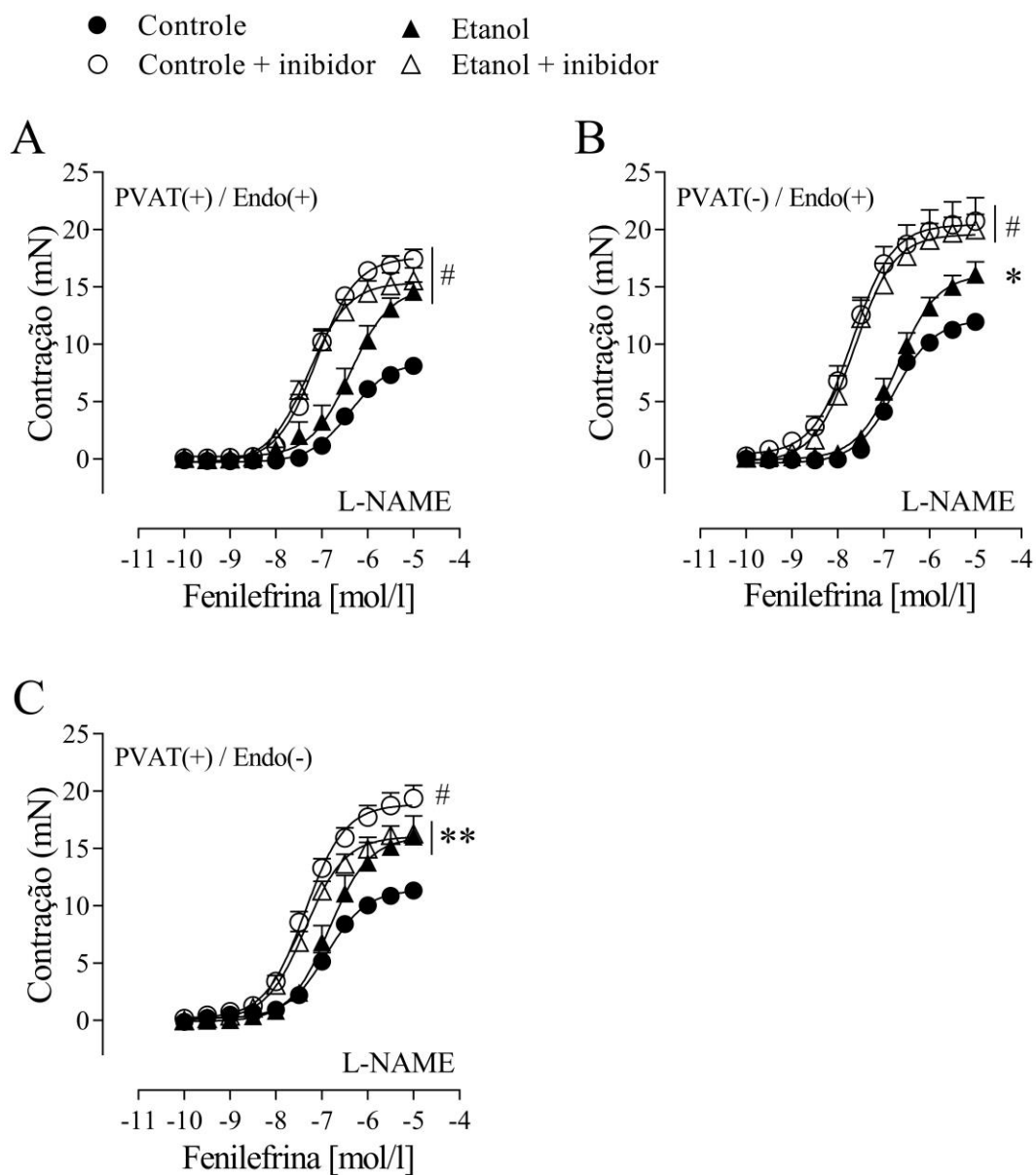


Figura 13. O consumo de etanol prejudica a via nitrérgica de maneira dependente do endotélio. Curvas concentração-resposta para fenilefrina foram obtidas na presença ou ausência do L-NAME (100 μ mol/l; A, B e C). Os resultados representam a média \pm EPM de n=5-8 animais por grupo. #Comparado ao grupo controle; **Comparado aos grupos controle e controle + inibidor; *Comparado aos grupos controle, controle + inibidor e etanol + inibidor; ($p < 0,05$; ANOVA two-way seguida do pós-teste de Bonferroni).

Tabela 6. Valores de E_{max} (mN) e pD_2 de fenilefrina em aortas PVAT(+)/Endo(+), PVAT(-)/Endo(+) e PVAT(+)/Endo(-) na presença do L-NAME ao término da 3ª semana de tratamento.

PVAT (+) / Endo (+)				
	Ausência do inibidor		L-NAME (100 μmol/l)	
	E_{max} (mN)	pD_2	E_{max} (mN)	pD_2
Controle	8,1 \pm 0,5 (15)	6,4 \pm 0,1	17,4 \pm 0,9 (10) ^a	7,1 \pm 0,1 ^b
Etanol	14,6 \pm 0,9 (11) ^a	6,4 \pm 0,1	15,6 \pm 1,1 (10) ^a	7,3 \pm 0,1 ^{bc}
PVAT (-) / Endo (+)				
	Ausência do inibidor		L-NAME (100 μmol/l)	
	E_{max}(mN)	pD_2	E_{max} (mN)	pD_2
Controle	11,9 \pm 0,5 (8)	6,8 \pm 0,1	20,7 \pm 2,0 (6) ^b	7,7 \pm 0,1 ^b
Etanol	16,1 \pm 1,1 (14) ^a	6,7 \pm 0,1	19,9 \pm 1,3 (7) ^b	7,6 \pm 0,1 ^b
PVAT (+) / Endo (-)				
	Ausência do inibidor		L-NAME (100 μmol/l)	
	E_{max} (mN)	pD_2	E_{max} (mN)	pD_2
Controle	11.3 \pm 0.4 (9)	6.8 \pm 0.1	19.4 \pm 1.1 (10) ^b	7.4 \pm 0.1 ^b
Etanol	15.7 \pm 1.6 (12) ^a	6.7 \pm 0.1 ^a	16.3 \pm 0.1 (10) ^{ac}	7.4 \pm 0.1 ^b

Os valores representam a média \pm EPM dos diferentes grupos experimentais; os números entre parênteses representam o n de cada grupo experimental; ^aDiferença em relação ao grupo controle; ^bDiferença em relação ao grupo controle e etanol; ^cDiferença em relação ao grupo controle + inibidor. ($p < 0,05$; *two-way* ANOVA seguida pelo pós-teste de Bonferroni).

5.4.2. Efeito do consumo de etanol sobre o balanço oxidativo

5.4.2.1. Determinação da concentração de $O_2^{\cdot-}$ e da atividade da SOD

Em situações fisiopatológicas, o PVAT pode sofrer uma alteração da sua ação modulatória e os fatores pró-contráteis se sobressaem aos fatores anti-contráteis. Podemos dar destaque ao $O_2^{\cdot-}$ que se originam no PVAT principalmente por meio da enzima NADPH oxidase [65]. Além disso, a adiponectina e a angiotensina (1-7) estão envolvidas fisiologicamente na regulação das ERO endotelial [114]. Assim, avaliamos se o consumo de etanol promoveu a superprodução de $O_2^{\cdot-}$. Não foram detectadas alterações na intensidade de fluorescência do DHE na aorta torácica ou PVAT entre os grupos (Figura 14A-C). Além disso, a quimioluminescência da lucigenina no PVAT não foi afetada pelo etanol (Figura 14D). Da mesma forma, a enzima responsável pela dismutação do $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 , denominada SOD (superóxido dismutase), não sofreu alterações no PVAT de ratos tratados com etanol (Figura 14E).

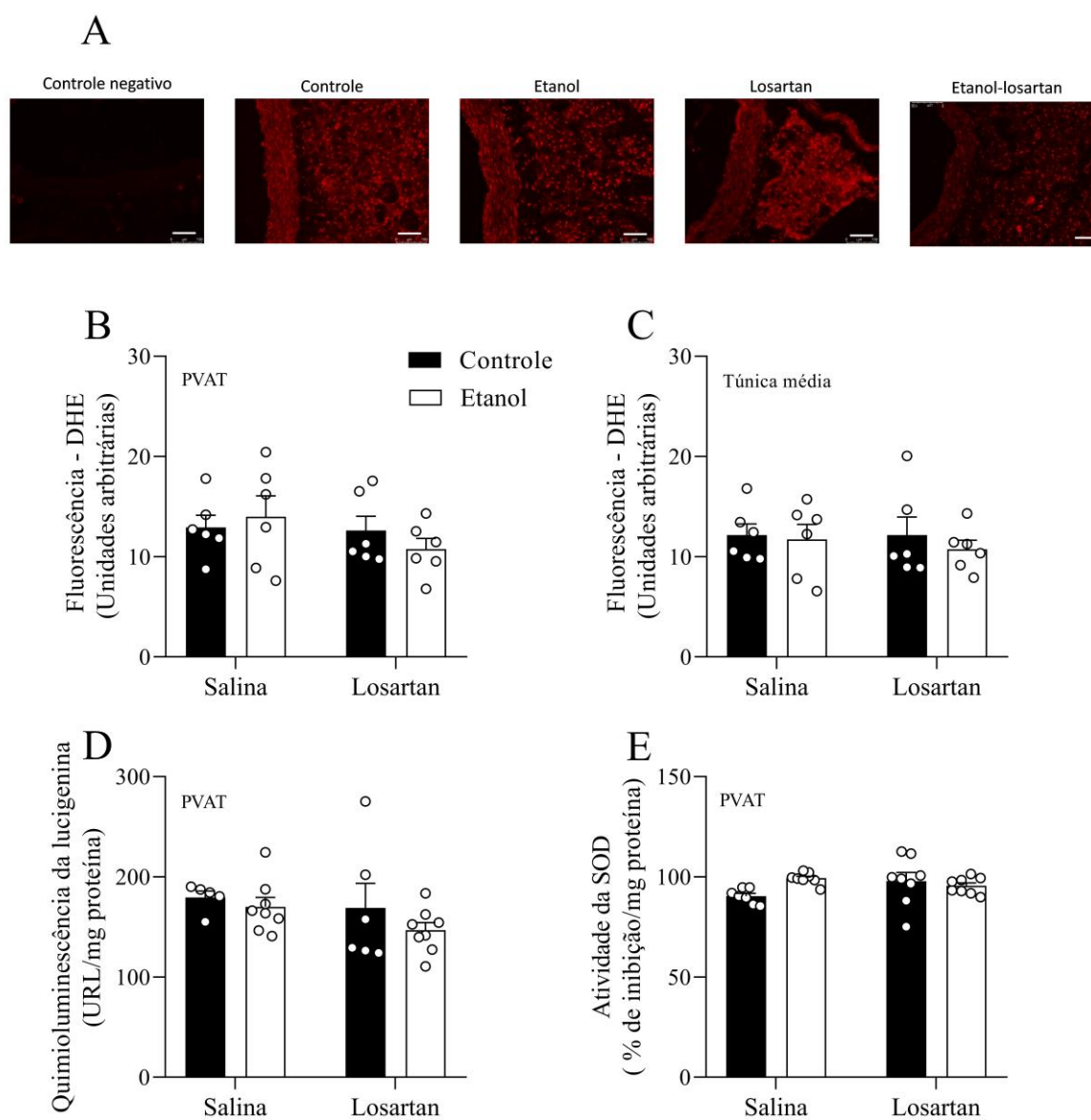


Figura 14. O consumo de etanol não altera a concentração de $O_2^{\cdot-}$ no PVAT e na túnica média e a atividade da SOD. Visualização *in situ* da geração de $O_2^{\cdot-}$ pela sonda fluorescente DHE (A). Os gráficos de barras representam a quantificação de fluorescência para DHE determinada em secções transversais do PVAT (B) e da túnica média das paredes da aorta (C). Geração de $O_2^{\cdot-}$ em PVAT foi determinada por ensaio de quimioluminescência da lucigenina (D). A atividade da SOD no PVAT foi determinada colorimetricamente (E). Os resultados representam a média \pm EPM de $n=5-8$ animais por grupo.

5.4.2.2. Efeito do consumo de etanol sobre a ação modulatória vascular de $O_2^{\cdot-}$

Em relação aos ensaios funcionais, interessantemente observamos que o sequestro do $O_2^{\cdot-}$ pelo tiron reverteu a perda do efeito anti-contrátil do PVAT induzida pelo etanol, além de diminuir a potência do agente contrátil em anéis aórticos com endotélio intacto, mas não sem endotélio (Figura 15A, B e D). Em anéis com endotélio intacto ou desnudado sem PVAT, o tiron também não reverteu o aumento da contração induzida pela fenilefrina promovida pelo etanol (Figura 15C e D). Isso confirma mais uma vez que a disfunção do PVAT induzida pelo etanol ocorre de maneira dependente do endotélio.

Na tabela 7 estão representados os valores de E_{max} e pD_2 para fenilefrina em aortas PVAT(+)/Endo(+), PVAT(+)/Endo(-), PVAT(-)/Endo(+) e PVAT(-)/Endo(-) de ratos do grupo controle e etanol na presença ou ausência do tiron.

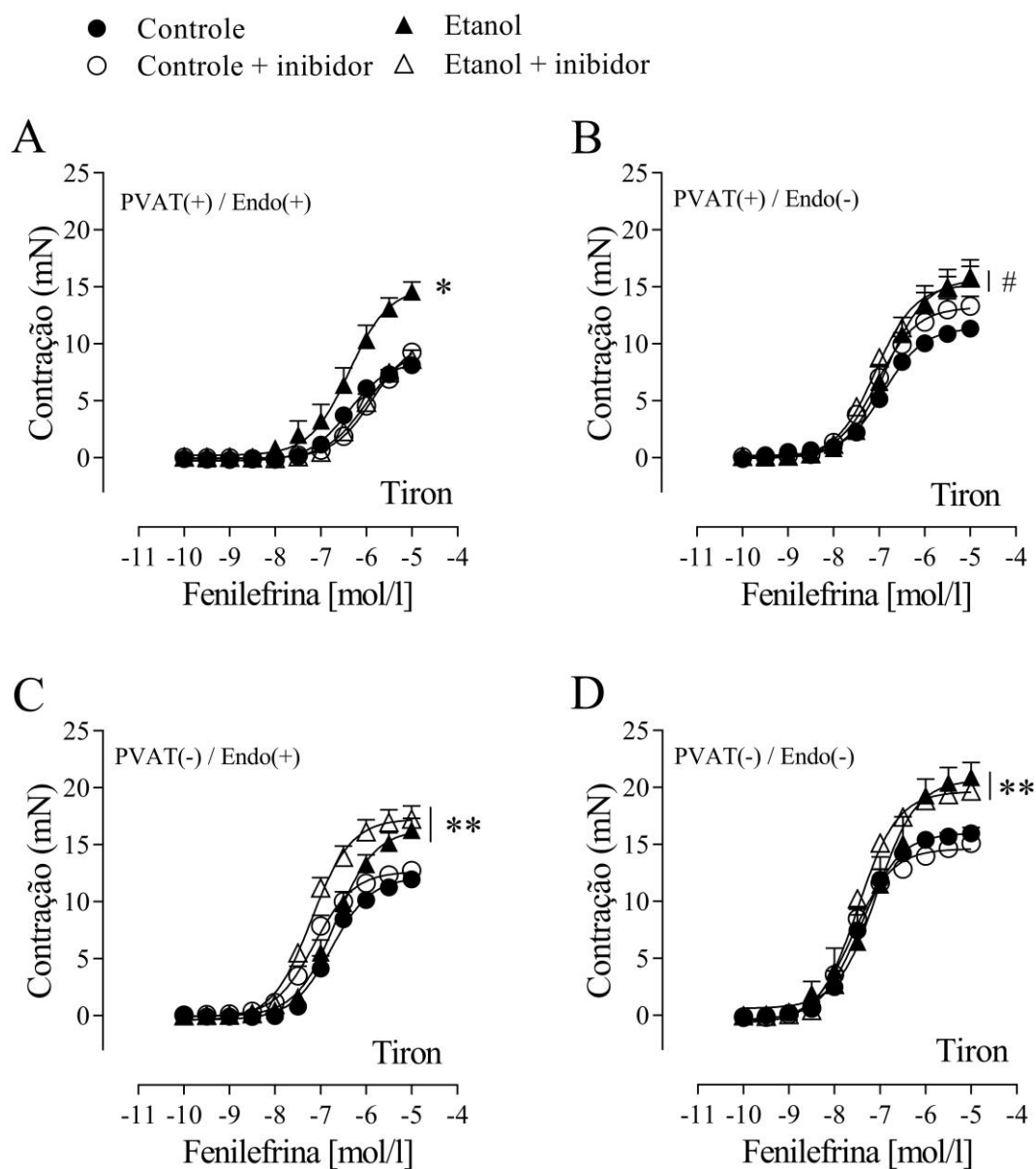


Figura 15. $O_2^{\cdot -}$ participa da perda do efeito anti-contrátil do PVAT de maneira dependente do endotélio induzida pelo consumo de etanol. Curvas concentração-resposta para fenilefrina foram obtidas na presença ou ausência do tiron ($10^3 \mu\text{mol/l}$; A, B, C e D). Os resultados representam a média \pm EPM de $n=5-8$ animais por grupo. #Comparado ao grupo controle; **Comparado aos grupos controle e controle + inibidor; *Comparado aos grupos controle, controle + inibidor e etanol + inibidor ($p < 0,05$; ANOVA two-way seguida de pós-teste de Bonferroni).

Tabela 7. Valores de E_{max} (mN) e pD_2 de fenilefrina em aortas PVAT(+)/Endo(+), PVAT(-)/Endo(+), PVAT(+)/Endo(-) e PVAT(-)/Endo(-) na presença do tiron ao término da 3ª semana de tratamento.

PVAT (+) / Endo (+)				
	Ausência do inibidor		Tiron ($10^3 \mu\text{mol/l}$)	
	E_{max} (mN)	pD_2	E_{max} (mN)	pD_{2u}
Controle	8,1 ± 0,5 (15)	6,4 ± 0,1	9,3 ± 0,7 (5)	5,9 ± 0,1 ^b
Etanol	14,6 ± 0,9 (11) ^d	6,4 ± 0,1	8,6 ± 0,8 (7)	6,0 ± 0,1 ^b
PVAT (+) / Endo (-)				
	Ausência do inibidor		Tiron ($10^3 \mu\text{mol/l}$)	
	E_{max}(mN)	pD_2	E_{max} (mN)	pD_2
Controle	11,3 ± 0,4 (9)	6,9 ± 0,1	13,3 ± 0,9 (5)	7,0 ± 0,1
Etanol	15,7 ± 1,7 (12) ^a	6,8 ± 0,1	15,8 ± 1,0 (6) ^a	7,1 ± 0,1
PVAT (-) / Endo (+)				
	Ausência do inibidor		Tiron ($10^3 \mu\text{mol/l}$)	
	E_{max} (mN)	pD_2	E_{max} (mN)	pD_2
Controle	11,9 ± 0,5 (8)	6,8 ± 0,1	12,7 ± 0,5 (8)	7,1 ± 0,1
Etanol	16,3 ± 1,1 (15) ^{ac}	6,7 ± 0,1 ^a	17,2 ± 1,2 (7) ^b	7,2 ± 0,1
PVAT (-) / Endo (-)				
	Ausência do inibidor		Tiron ($10^3 \mu\text{mol/l}$)	
	E_{max} (mN)	pD_2	E_{max} (mN)	pD_2
Controle	15,9 ± 0,5 (8)	7,4 ± 0,1	15,1 ± 1,4 (9)	7,5 ± 0,1
Etanol	20,9 ± 1,3 (9) ^{ac}	7,1 ± 0,1 ^d	19,7 ± 0,5 (10) ^{ac}	7,5 ± 0,1

Os valores representam a média ± EPM dos diferentes grupos experimentais; os números entre parênteses representam o n de cada grupo experimental; ^aDiferença em relação ao grupo controle; ^bDiferença em relação ao grupo controle e etanol; ^cDiferença em relação ao grupo controle + inibidor; ^dDiferença em relação ao grupo controle, controle + inibidor e etanol + inibidor. ($p < 0,05$; *two-way* ANOVA seguida pelo pós-teste de Bonferroni).

5.4.2.3. Determinação da concentração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e da atividade da catalase e GPx

O H₂O₂ é gerado a partir da dismutação O₂^{•-} e é considerado uma das principais espécies reativas de oxigênio que levam ao estresse oxidativo, entretanto no PVAT periaórtico, o H₂O₂ é um importante mediador do efeito anti-contrátil do PVAT já que seus efeitos na vasculatura são concentração dependente [72, 115]. Apreciando a importância do H₂O₂ para o efeito anti-contrátil do PVAT periaórtico, foram determinados seus níveis, bem como as atividades da catalase e da glutathione peroxidase, as quais são enzimas responsáveis por controlar a produção desse peróxido. Não encontramos alterações na concentração de H₂O₂ no PVAT após tratamento com etanol (Figura 16A). Da mesma forma que as atividades da catalase e da glutathione peroxidase no PVAT não foram afetadas (Figura 16B e C).

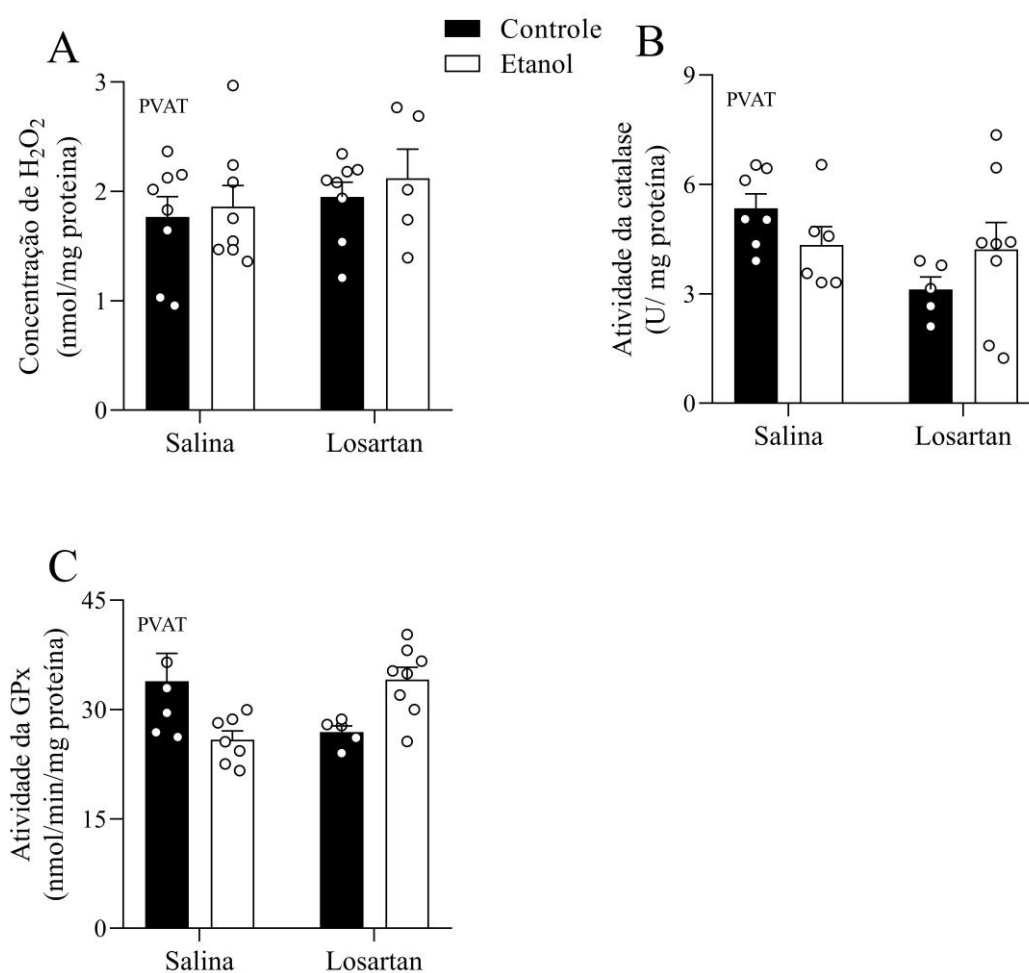


Figura 16. O consumo de etanol não altera a concentração de H₂O₂, atividade da catalase e do GPx no PVAT periaórtico. Concentração de H₂O₂ em PVAT foi determinada por kit colorimétrico (A). Atividade da catalase (B) e da GPx (C) no PVAT foi determinada colorimetricamente. Os resultados representam a média ± EPM de n=5-8 animais por grupo.

5.4.3. Efeitos do consumo de etanol sobre mediadores pró-inflamatórios no PVAT

5.4.3.1. Determinação das concentrações de MCP-1, RANTES e TNF- α e das atividades de MPO e NAG

Também investigamos se o consumo de etanol favorece um fenótipo pró-inflamatório do PVAT, o que poderia colaborar para as alterações funcionais do PVAT. O MCP-1, uma quimiocina que tem como função, regular a migração e infiltração de monócitos/macrófagos, não apresentou alterações entre os grupos (Figura 17A). Confirmando esses dados, o consumo de etanol não alterou as atividades de NAG (Figura

17C) ou MPO (Figura 17D) no PVAT, sugerindo que não há aumento de infiltração de macrófagos e neutrófilos respectivamente. Além disso, concentrações de TNF- α , uma das principais citocinas pró-inflamatórias produzidas pela infiltração de macrófagos, também não foram detectadas alterações após tratamento com o etanol (Figura 17E). Verificamos também a expressão de RANTES, uma quimiocina responsável pela infiltração de linfócitos T e não observamos alterações entre os grupos (Figura 17B).

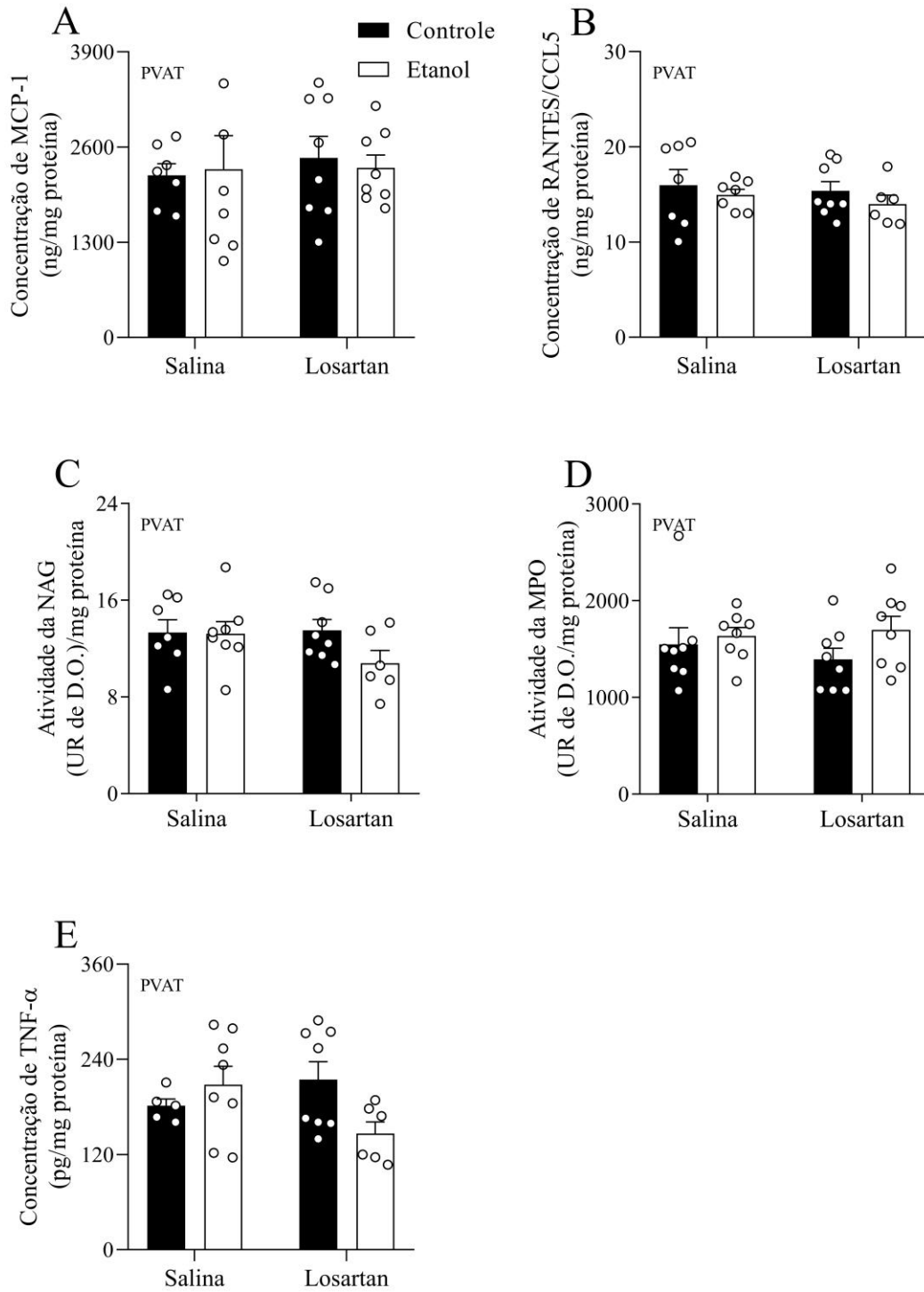


Figura 17. O consumo de etanol não altera os mediadores pró-inflamatórios no PVAT periaórtico. Concentração de MCP-1 (A) RANTES (B) e TNF- α (E) em PVAT foram determinadas por ELISA. Atividade da NAG (C) e MPO (D) foram determinadas por colorimetria. Os resultados representam a média \pm EPM de n=5-8 animais por grupo.

5.4.3.2. Determinação do recrutamento de macrófagos

Finalmente, para confirmar os resultados anteriores, avaliamos a infiltração de macrófagos no PVAT pela marcação com anticorpos para as moléculas de superfície em questão: CD45, CD11b, CD68 e RT1B. O consumo de etanol não promoveu aumento no número de células CD45+CD11b+CD68+ no PVAT (Figura 18A-C) e nem aumento do número de macrófagos expressando CD45+CD11b+CD68+RT1B (Figura 18A, D e E), sendo o RT1B um marcador de ativação. Dessa forma, verificamos que o etanol não promove aumento do recrutamento e nem ativação de macrófagos no PVAT.

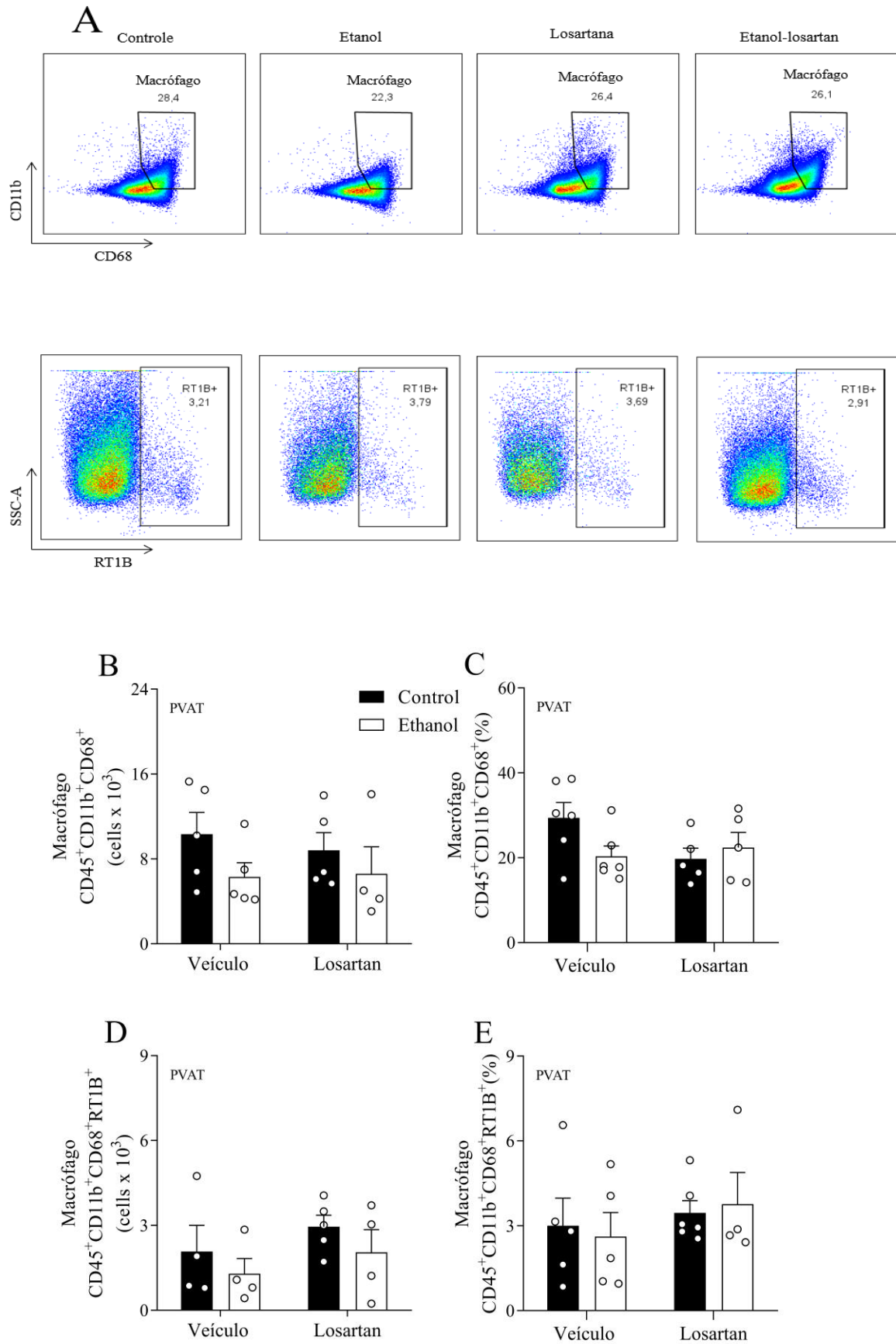


Figura 18. O consumo de etanol não promove infiltração de macrófagos no PVAT periaórtico. Imagem representativa das estratégias de *gating* para a identificação de macrófagos totais (A) Total de singletos de células vivas de macrófagos (B) e porcentagem de macrófagos que expressam CD11b e CD68 controlados em

células vivas CD45+ (C). Singletos de células de macrófagos vivos expressando RT1B (D) e porcentagem de macrófagos expressando RT1B controlados em células vivas CD11b+ e CD68+ (E). Os resultados representam média \pm SEM de n=4-6 animais por grupo.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

O modelo de tratamento de etanol escolhido para o presente estudo, promoveu redução no consumo de ração e líquido (solução de etanol) dos animais em comparação com aqueles que receberam água. A ingestão crônica de etanol está associada a mudanças no estado nutricional do organismo [5, 56, 116]. Isso acontece porque o etanol é uma fonte de calorias isentas de vitaminas, proteínas e minerais, o que resulta na diminuição da absorção de nutrientes, já que o etanol interfere na ingestão de outros alimentos ricos em fontes calóricas que apresentam os elementos vitais para o organismo [117, 118]. Entretanto, vale ressaltar que o modelo de consumo crônico de etanol escolhido foi com base em estudos prévios de nosso laboratório que demonstraram que este tratamento atinge uma faixa de concentração sanguínea de etanol de 35 a 40 mmol/l em animais [27, 30, 51], a qual se assemelha com as concentrações de etanol encontradas no sangue de humanos considerados consumidores crônicos [104], o que é suficiente para promover as alterações cardiovasculares [27, 119]. De fato, observamos por pletismografia aumento da pressão arterial sistólica a partir da 5ª semana de tratamento com etanol. Ao utilizar um método mais refinado, dados de animais canulados confirmaram esse resultado, uma vez que na 9ª semana de tratamento com etanol houve aumento da pressão arterial sistólica, diastólica e média, sem alterações na 3ª semana de tratamento. O consumo abusivo de etanol está entre as causas associadas à evolução da hipertensão arterial e encontra-se como um dos principais fatores de risco envolvido no desenvolvimento de doenças cardiovasculares [103].

Os mecanismos que justificam o desenvolvimento da hipertensão arterial e alteração na contratilidade vascular associados ao consumo de etanol, incluem a estimulação do SRAA. Diversos estudos descrevem a associação do consumo de etanol e o aumento dos níveis plasmáticos de ANGI, ANGII, atividade plasmática da renina e ECA [28-30]. Dessa forma, nossos resultados estão de acordo com estudos prévios, uma vez que ao tratar os animais com o losartan, antagonista dos receptores AT₁, confirmamos que o SRAA mediava

não só a hipertensão arterial induzida por etanol, como também a hipercontratilidade vascular em resposta à fenilefrina em aortas torácicas.

As alterações na contratilidade vascular em decorrência do consumo de etanol já são bem descritas na literatura [27, 30, 41, 120]. De fato, em nosso estudo demonstramos que aortas torácicas na ausência do PVAT apresentaram aumento da contração vascular em resposta à fenilefrina de maneira independente do endotélio. Portanto, o etanol atua na musculatura lisa vascular promovendo hipercontratilidade e dentre as causas envolvidas está a ativação do receptor AT_1 , uma vez que o tratamento com o losartan preveniu essa resposta.

Além disso, demonstramos que o efeito do etanol é agonista dependente na musculatura lisa, já que em resposta à serotonina não observamos alterações na contração vascular de aortas torácicas nas mesmas condições descritas anteriormente. Isso pode ser em decorrência da variação dos efeitos do etanol em diferentes vias intracelulares de acordo com o agente contrátil [102, 120]. Diversos trabalhos na literatura já demonstraram a associação entre o consumo de etanol e a ativação do sistema nervoso simpático (SNS) [121, 122]. O aumento da atividade simpática estimula a atividade dos receptores adrenérgicos [123], o que pode justificar o aumento da contratilidade vascular de aortas torácicas de animais tratados com etanol estimuladas com a fenilefrina, um agonista dos receptores α_1 -adrenérgicos. Além disso, vale ressaltar que há uma estreita relação do SNS com o SRAA, ou seja, um aumento da atividade simpática pode resultar na ativação sistêmica do SRAA, com liberação de renina na circulação e conseqüentemente aumento da produção de ANG II [124].

Apesar de estar bem estabelecido que o consumo de etanol induz disfunção vascular, há poucas informações acerca dos efeitos do consumo de etanol sobre a ação modulatória que o PVAT exerce na vasculatura. O efeito do etanol pode variar de acordo com o território vascular, portanto o foco do nosso trabalho foi investigar os efeitos do etanol sobre a função do PVAT. Observamos em nosso trabalho que ao final do tratamento, o PVAT deixava de

apresentar seu efeito anti-contrátil fisiológico e essa resposta estava associada ao endotélio. Vale ressaltar que ao contrário do que vimos anteriormente em aortas na ausência do PVAT, o efeito prejudicial do etanol sobre o PVAT foi em resposta tanto à fenilefrina, quanto à serotonina. Portanto, conseguimos certificar com esse resultado que os efeitos do etanol não se resumem apenas à musculatura lisa, mas também afetam o PVAT e indiretamente o endotélio.

Uma vez que o PVAT é considerado um importante regulador do tônus vascular, o comprometimento de sua ação modulatória pode refletir diretamente no funcionamento fisiológico do sistema cardiovascular [62]. De fato, nossos achados revelaram que o prejuízo nos efeitos do PVAT pode contribuir para a disfunção vascular e hipertensão arterial induzida pelo etanol, uma vez que identificamos que a partir da 3ª semana de tratamento com etanol, momento que precede a hipertensão arterial, já ocorre a perda do efeito anti-contrátil do PVAT e após 9 semanas, resultados semelhantes foram encontrados. Nesse sentido, concluímos que isso pode ser um dos mecanismos pelo qual o etanol afeta a função vascular predispondo à hipertensão arterial. De fato, foi demonstrado que a disfunção do PVAT pode ser considerado como um marcador precoce de doenças cardiovasculares [125, 126]

Além disso, nossos resultados mostraram que o losartan também preveniu a perda do efeito anti-contrátil do PVAT induzido pelo consumo crônico de etanol, evidenciando um papel dos receptores AT₁ nessa resposta. Esses achados coincidem com estudos prévios que apontam que o PVAT periaórtico expressa receptores AT₁ e de fato, a ativação desses receptores exerce efeitos diretos no PVAT em condições fisiopatológicas como, por exemplo, na hipertensão arterial [110], diabetes tipo 2 [127] e síndrome metabólica [95].

Como mencionado anteriormente, em condições fisiológicas, o PVAT apresenta majoritariamente efeito anti-contrátil através da liberação de fatores vasorelaxantes, porém em situações fisiopatológicas, ocorre uma alteração no perfil secretório do PVAT [114].

Portanto, com o intuito de investigar o mecanismo pelo qual ocorre a perda do efeito anti-contrátil do PVAT induzida pelo consumo crônico de etanol e o possível envolvimento do SRAA nessa resposta, começamos por avaliar possíveis alterações nos fatores vasorelaxantes derivados do PVAT. Nossos achados demonstraram que a perda do efeito anti-contrátil do PVAT induzida pelo etanol ocorreu de maneira dependente do endotélio. Considerando esses dados, os experimentos delineados com o propósito de avaliar os mecanismos envolvidos nessa resposta, teve como foco, mediadores liberados pelo PVAT que apresentam efeito de maneira dependente do endotélio.

Sabemos que o PVAT apresenta efeito anti-contrátil pela liberação de moléculas bioativas que atuam de maneira dependente e independente do endotélio [58]. Uma vez que o PVAT pode ter seus efeitos dependentes do endotélio, presume-se que o PVAT pode atuar como um regulador do estado fisiológico das células endoteliais. Exemplificando os mediadores que exercem seus efeitos vasorelaxantes por um mecanismo associado à túnica íntima vascular estão a angiotensina (1-7), PGI₂, adiponectina e leptina [74, 128-130].

Começamos por investigar o impacto do etanol sobre a angiotensina (1-7), um peptídeo produzido por meio da atividade da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) [131] que promove vasodilatação através da ativação dos receptores *Mas* e consequente liberação de NO endotelial [78, 132]. Inicialmente, nossos achados funcionais demonstraram que ao antagonizar o receptor *Mas* utilizando o A779, ocorreu aumento da contração de aortas torácicas exclusivamente na presença do PVAT e endotélio de animais do grupo controle, o que sugere a participação da angiotensina (1-7) no efeito anti-contrátil dependente do endotélio do PVAT em situações fisiológicas, tais achados reforçam estudos anteriores [72, 78, 125]. Entretanto, demonstramos que o etanol prejudicou a função fisiológica da angiotensina (1-7) proveniente do PVAT, já que não observamos o mesmo aumento da contração vascular de aortas torácicas de ratos do grupo etanol ao utilizar esse antagonista, sugerindo uma produção/ação reduzida desse mediador vasorelaxante. De fato,

trabalhos anteriores já demonstraram o prejuízo da função da angiotensina (1-7) como um dos mecanismos responsáveis pela perda da função anti-contrátil do PVAT observada em animais espontaneamente hipertensos (SHR) [133].

Uma vez que demonstramos que os receptores AT₁ participam da perda do efeito anti-contrátil do PVAT induzida pelo consumo de etanol, investigamos também os efeitos dos receptores AT₁ sobre a ação da angiotensina (1-7) derivada do PVAT. Nossos resultados demonstraram que aortas torácicas na presença do PVAT de animais do grupo etanol-losartan responderam ao A779 de maneira similar às aortas torácicas dos animais que não receberam etanol, sugerindo que o bloqueio do receptor AT₁ preveniu os efeitos deletérios do etanol sobre a função do peptídeo em questão. Possivelmente, a ANG II ao ser impedida de promover ativação de seus receptores, tornou-se mais disponível para sofrer ação da enzima ECA2, resultando no aumento da produção da angiotensina (1-7) e favorecendo assim, sua ação. Além disso, vale ressaltar que esse achado ocorreu apenas em aortas na presença do endotélio, portanto é possível que os efeitos do receptor AT₁ sobre a angiotensina (1-7) ocorra a nível endotelial.

Estudos prévios demonstraram que o eixo angiotensina (1-7)/receptor *Mas* atua como um contrarregulador dos efeitos mediados pela ANG II/receptor AT₁ [134, 135]. Ademais, foi demonstrado que a angiotensina (1-7) pode atuar como um antagonista dos receptores AT₁, diminuindo dessa forma o número de receptores disponíveis para a ligação da ANG II [136]. Entretanto, quando o octapeptídeo se apresenta em altas concentrações, o efeito vasorelaxante mediado pelos receptores *Mas* endoteliais e angiotensina (1-7) deixa de ser produzido, por um mecanismo que envolve aumento da produção de ERO e redução da biodisponibilidade de NO [39, 40].

Em seguida, avaliamos os efeitos do etanol na adiponectina, uma adipocina liberada pelo PVAT que induz o relaxamento dependente do endotélio, fosforilando a eNOS e

consequentemente produzindo NO [129]. Além de modular a produção de ERO endotelial, a adiponectina apresenta efeitos anti-inflamatórios e sensibilizadores da insulina [137, 138].

Estudos prévios têm demonstrado redução nos níveis da adiponectina na fisiopatologia de doenças cardiovasculares associadas à hipertensão, o que pode indicar o envolvimento dessa adipocina nessas alterações [139, 140]. Nossos resultados demonstraram que o tratamento com etanol diminuiu a concentração de adiponectina no PVAT periaórtico dos animais e o losartan foi capaz de prevenir esse efeito, sugerindo que a ativação do receptor AT_1 desempenha um papel importante nessa resposta. Este achado corrobora estudos anteriores que demonstraram que a ANG II via ativação dos receptores AT_1 é capaz de reduzir os níveis de adiponectina por inibir o receptor γ ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR γ), o fator de transcrição responsável pela produção de adiponectina [140-142]. Isto pode ajudar a explicar a participação dos receptores AT_1 na redução dos níveis de adiponectina no PVAT de ratos tratados com etanol. Muitos estudos têm investigado a relação da adiponectina e SRAA e sugere-se que a redução da adiponectina pela ANG II está associada com diminuição de NO, aumento de ERO e a inflamação provocada pela mesma via receptor AT_1 [85, 143].

Dentre os fatores relaxantes derivados do PVAT que atuam via endotélio, a leptina também está em destaque, um hormônio peptídico secretado pelos adipócitos que apresenta diversas funções conhecidas, dentre elas a de controle metabólico na regulação da ingestão de alimentos, estímulo da termogênese e regulação do tônus vascular, ação que depende de um endotélio intacto e funcional [137, 144]. Nossos resultados demonstraram que o tratamento com etanol não afetou os níveis de leptina no PVAT, sugerindo que essa adipocina não está envolvida na disfunção do PVAT induzida pelo etanol. A leptina, por sua vez, está presente em maiores quantidades no tecido adiposo branco e vem sendo associada em grande parte com efeitos prejudiciais no PVAT [145, 146], o que pode justificar a ausência de sua participação nos efeitos do presente estudo.

Um outro mediador vasorelaxante que também pode ser produzido e liberado pelo PVAT é a prostaciclina (PGI_2). Esse prostanóide ativa os receptores IP para promover sua ação vasorelaxante e alguns estudos têm demonstrado que seu efeito pode ser de maneira dependente do endotélio [72, 147]. Em muitas situações fisiopatológicas, a PGI_2 pode sofrer alterações e causar prejuízos no efeito anti-contrátil do PVAT, portanto optamos por investigar se o etanol poderia afetar a ação desse prostanóide. No presente estudo, observamos que ao utilizar o RO1138452, um antagonista do receptor IP, não ocorre alterações na contração do grupo controle e etanol. Sendo assim, sugere-se que a PGI_2 não está envolvida nos efeitos do etanol aqui descritos. Corroborando esses resultados, verificamos que não houve alteração da concentração do 6-keto- $PGF1\alpha$ no PVAT, um metabólito estável da PGI_2 , o que possivelmente descarta a participação da PGI_2 na perda do efeito anti-contrátil do PVAT induzida pelo etanol. Estudo do nosso grupo de pesquisa também não encontrou envolvimento desse prostanóide nos efeitos vasculares induzida pelo consumo de etanol [103].

Nossos resultados até aqui, demonstraram que os fatores que estariam envolvidos na perda do efeito anti-contrátil do PVAT induzido pelo etanol, seriam a adiponectina e a angiotensina (1-7). Fisiologicamente, ambos os fatores estão diretamente relacionadas com o aumento da biodisponibilidade de NO endotelial e controle de ERO. Uma vez que demonstramos redução da produção/ação dos mesmos, avaliamos a seguir se o consumo de etanol influenciaria os níveis de NO e ERO.

O NO é um dos principais mediadores do efeito anti-contrátil do PVAT em aorta torácica de ratos [58]. Portanto, começamos por avaliar se o etanol comprometeu a via nitrérgica. Nossos resultados funcionais demonstraram a participação do NO no efeito anti-contrátil fisiológico do PVAT, visto que o L-NAME aumentou a contração vascular em aortas na presença do PVAT com ou sem endotélio de animais do grupo controle, achado este que corrobora estudos prévios [58, 72, 112, 148]. Nossos resultados referentes ao grupo

etanol sugeriram que não houve alteração dos níveis de NO no PVAT, uma vez que o L-NAME promoveu um deslocamento da curva para esquerda, indicando aumento de potência do agente contrátil em aortas na presença do PVAT, com ou sem endotélio. Além disso, não observamos alteração na concentração de NOx do PVAT periaórtico entre os grupos e nem a intensidade de fluorescência do DAF-2DA no PVAT e na túnica média foram afetadas pelo etanol. Porém, os experimentos funcionais com o L-NAME indicaram que o consumo de etanol poderia afetar a biodisponibilidade de NO endotelial. Portanto, é possível que os efeitos prejudiciais do etanol no PVAT que foram dependentes do endotélio, podem estar associados à uma redução de NO endotelial.

As ERO compreendem um grupo de moléculas diferentes, incluindo principalmente o H_2O_2 e $\text{O}_2^{\cdot-}$ [149]. Portanto é importante compreender o papel específico de cada uma dessas espécies no efeito fisiopatológico do etanol no PVAT. O $\text{O}_2^{\cdot-}$ em excesso pode promover danos ao DNA e lipídeos de membrana, remodelamento dos vasos sanguíneos e ainda, pode reagir com o NO disponível, o que leva a formação do peroxinitrito ($\text{ONOO}^{\cdot-}$), evento que pode levar à diminuição da biodisponibilidade do NO e a perda do efeito anti-contrátil do PVAT [150]. Além disso, o próprio SRAA é um importante fator que contribui para geração de $\text{O}_2^{\cdot-}$ por meio da ativação da NAD(P)H oxidase em vasos de animais tratados cronicamente com etanol [27].

Ao investigar se as ERO estariam envolvidas na perda do efeito anti-contrátil do PVAT induzido pelo etanol, optamos por avaliar a resposta funcional de aortas na presença do PVAT incubadas com o tiron, um sequestrador de $\text{O}_2^{\cdot-}$. Como resposta, identificamos que o mesmo foi capaz de reverter o efeito prejudicial do etanol sobre o PVAT exclusivamente em aortas na presença do endotélio. Dessa forma, reforçamos mais uma vez que os efeitos do etanol no PVAT são dependentes do endotélio e possivelmente o etanol estaria favorecendo a produção de ERO endotelial. Neste cenário, o tiron pode estar revertendo a perda do efeito anti-contrátil do PVAT ao impedir a diminuição da biodisponibilidade

endotelial do NO ao diminuir a geração de $O_2^{\bullet-}$, já que as ERO derivadas da NADPH oxidase podem reagir com o NO diminuindo sua biodisponibilidade. Ademais, o etanol não afetou a quimiluminescência da lucigenina no PVAT e nem a intensidade da fluorescência do DHE no PVAT e túnica média, reforçando a ideia de que o possível aumento de $O_2^{\bullet-}$ sugerido nos experimentos funcionais estaria ocorrendo no endotélio em decorrência de um efeito prejudicial no PVAT. Além disso, não observamos alterações na atividade da SOD no PVAT, enzima antioxidante responsável pela catalisação da dismutação do $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 e O_2 [58, 71, 125].

Trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa demonstraram que os receptores AT_1 estão associados com o aumento de $O_2^{\bullet-}$ e diminuição de NO em aortas torácicas de ratos que foram submetidos à protocolos mais longos de tratamento com etanol [27, 30, 103]. Porém o foco do nosso trabalho foi investigar os mecanismos que precedem a hipertensão arterial dando destaque aos efeitos do receptor AT_1 sobre o PVAT. Portanto, é de extrema relevância considerarmos o período de tratamento do estudo em questão e o território vascular para compreender nossos achados demonstrados até aqui.

Embora não tenhamos avaliado o efeito direto das alterações da produção/ação da adiponectina e da angiotensina (1-7) sobre os níveis de NO e ERO endotelial, podemos levantar a hipótese de que ambos fatores alterados pelo etanol estejam colaborando para a diminuição do NO e aumento de $O_2^{\bullet-}$ endotelial. Estudos experimentais demonstraram que a adiponectina e a angiotensina (1-7) estimula a produção de óxido nítrico endotelial, além de controlar diretamente a regulação da atividade da NADPH oxidase [151-153]. Ademais, como o losartan preveniu a disfunção do PVAT e a perda da função/produção da angiotensina (1-7) e adiponectina induzida pelo etanol, podemos sugerir que os receptores AT_1 localizados nas células endoteliais seriam responsáveis pelo aumento na geração de $O_2^{\bullet-}$, o que por sua vez reduziria a biodisponibilidade do NO.

O H_2O_2 , além de ser mais um tipo de ERO, é um importante modulador do efeito anti-contrátil do PVAT em situações fisiológicas. Entretanto, o H_2O_2 tem efeitos parácrinos na vasculatura que pode provocar tanto vasoconstrição, quanto vasorelaxamento de maneira dependente da concentração [154, 155]. Portanto, entendendo a importância do H_2O_2 para o efeito anti-contrátil do PVAT, investigamos se o etanol estaria afetando sua produção no PVAT. O consumo de etanol não afetou a concentração de H_2O_2 no tecido em questão, nem as atividades da catalase e da glutathione peroxidase, duas enzimas que desempenham um papel crucial na regulação dos níveis de H_2O_2 . O fato do etanol não ter afetado os níveis de H_2O_2 , um fator relaxante independente do endotélio derivado do PVAT, está de acordo com nossos resultados, fortalecendo o raciocínio de que a disfunção do PVAT induzida pelo etanol é um fenômeno dependente do endotélio.

Em muitas situações em que o PVAT se torna disfuncional, ocorre a secreção de fatores pró-inflamatórios, resultando em um risco aumentado de doenças cardiovasculares em decorrência da disfunção vascular provocada pela resposta inflamatória [63, 156]. A ANG II, por exemplo, está diretamente relacionada com um fenótipo pró-inflamatório do PVAT durante a hipertensão, levando à disfunção do PVAT e à perda de seu efeito anti-contrátil. Em nosso trabalho, encontramos que o receptor AT_1 participa das alterações fisiopatológicas do PVAT induzidas pelo etanol e que essa resposta está associada com o prejuízo da ação/produção da angiotensina (1-7) e adiponectina respectivamente. A adiponectina, por sua vez é uma das adipocinas mais abundantes secretadas pelo PVAT que exerce efeitos antiinflamatórios, diminuindo a expressão de citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e TNF- α e inibindo a produção de moléculas de adesão celular ao suprimir a via do fator nuclear kappa-B (NF- κ B) [157]. Baseando-se nessas informações, investigamos se ocorreu uma resposta inflamatória no PVAT em decorrência do consumo crônico de etanol que poderia justificar o prejuízo vascular.

A proteína quimioatrativa de monócitos-1 (MCP-1/CCL2) é uma quimiocina que tem como função a de regular a migração e infiltração de monócitos/macrófagos [158]. No PVAT, os receptores AT₁ promovem aumento na expressão de MCP-1 com maior acúmulo de macrófagos, que desempenham uma ação pró-inflamatória ao secretar TNF- α [90, 159]. Este último induz disfunção vascular por múltiplos mecanismos, incluindo redução da biodisponibilidade de NO e aumento na geração de ROS [160]. Nossos achados revelaram que o consumo de etanol não alterou a concentração de MCP-1 e nem favoreceu o acúmulo de macrófagos no PVAT. Para confirmar tais resultados, avaliamos ainda a atividade da acetilglucosaminidase (NAG), a qual é uma enzima produzida por macrófagos e é utilizada para detectar o acúmulo/ativação de macrófagos teciduais [161] e nenhuma alteração foi encontrada entre os grupos. Além disso, o etanol também não promoveu aumento da citocina TNF- α no PVAT, sugerindo que essas células não contribuem para a disfunção do PVAT induzida pelo etanol.

Sabe-se também que a ANG II induz acúmulo de linfócitos T no PVAT por meio do aumento da expressão da quimiocina RANTES (*regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*), também conhecida como CCL5 [159]. Essa resposta está diretamente associada com aumento de ERO e disfunção vascular [90]. Entretanto, não observamos alterações na concentração da quimiocina RANTES no PVAT entre os grupos, o que descarta mais uma vez, a participação de uma resposta inflamatória nas alterações da ação modulatória do PVAT.

Também investigamos o possível acúmulo de neutrófilos no PVAT, uma vez que o consumo de etanol foi previamente descrito por promover o acúmulo vascular dessas células [98, 162]. Avaliamos a atividade da mieloperoxidase (MPO), uma enzima presente nos neutrófilos que invade tecidos inflamados e atua catalisando a reação entre o H₂O₂ e o cloreto para gerar ácido hipocloroso, um agente oxidante tóxico, sendo assim o MPO é considerada um marcador de acúmulo/ativação de neutrófilos [161, 163-165]. Nenhuma

alteração na atividade da MPO foi detectada no PVAT de ratos tratados com etanol, sugerindo que o etanol não promoveu o acúmulo de neutrófilos.

Dessa forma, após uma investigação detalhada sobre uma possível resposta inflamatória induzida pelo etanol no PVAT, concluímos que a mudança do PVAT para um fenótipo pró-inflamatório não é responsável pela perda do efeito anti-contrátil do PVAT induzido pelo etanol. Entretanto, é importante ressaltar que o efeito do etanol é tempo dependente e o presente estudo demonstrou os efeitos do etanol com apenas 3 semanas de tratamento e especificamente no PVAT, portanto os parâmetros pró-inflamatórios não sofreram alterações possivelmente em decorrência ao período de tratamento. Estudos prévios demonstraram que um período mais longo de tratamentos com etanol induz infiltração de neutrófilos e aumento de produção de citocinas pró-inflamatórias na vasculatura [97, 98, 162].

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

Nossos resultados esclarecem os mecanismos envolvidos na disfunção vascular que precedem a hipertensão arterial induzida pelo etanol, dando destaque aos receptores AT_1 que apresentaram papel crucial na perda do efeito anti-contrátil do PVAT. Essa resposta é dependente do endotélio e está associada à diminuição da produção/ação de adiponectina e angiotensina (1-7) respectivamente. Ademais, observamos um possível aumento de $O_2^{\cdot-}$ com consequente redução de NO a nível endotelial, sem o envolvimento de mediadores pró-inflamatórios. Nossas descobertas fornecem um mecanismo mais detalhado sobre os efeitos cardiovasculares induzido pelo consumo de etanol, viabilizando novas abordagens terapêuticas para pacientes com transtorno associado ao consumo abusivo de etanol.

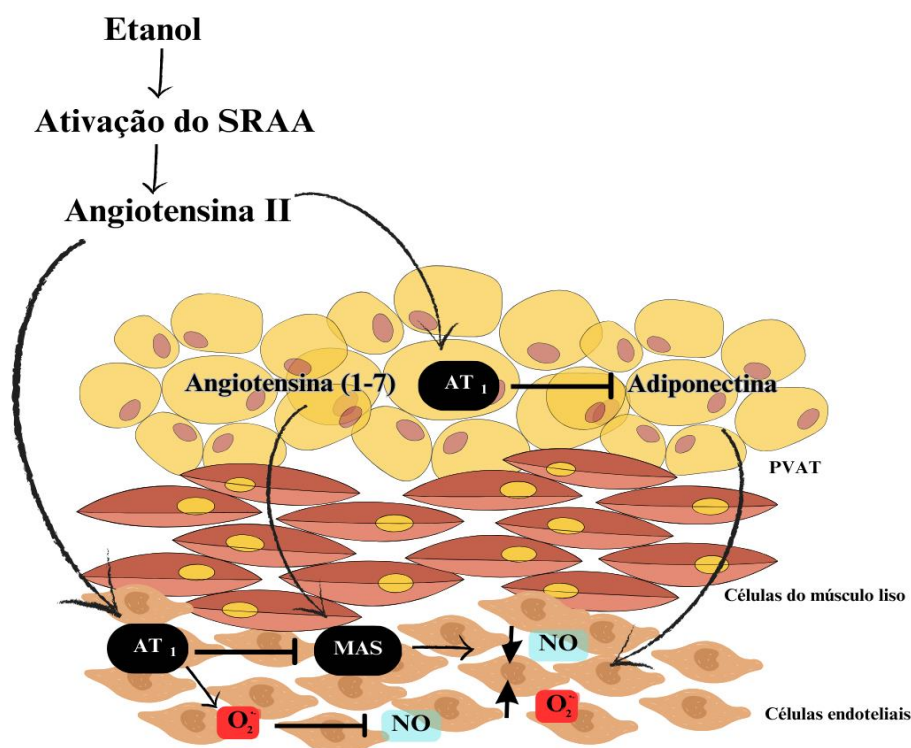


Figura 19. Esquema representativo da conclusão do estudo. O consumo de etanol promove ativação do SRAA. O receptor AT_1 prejudica a produção/ação de adiponectina e angiotensina (1-7) respectivamente, isso pode levar ao aumento de $O_2^{\cdot-}$ e diminuição de NO endotelial. NO: óxido nítrico; $O_2^{\cdot-}$: ânion superóxido; AT_1 : receptor AT_1 da angiotensina; Mas: receptor Mas; SRAA: sistema renina angiotensina aldosterona; PVAT: tecido adiposo perivascular.

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

1. Ford ES, Bergmann MM, Boeing H, Li C, Capewell S. Healthy lifestyle behaviors and all-cause mortality among adults in the United States. *Preventive medicine*. 2012;55(1):23-7.doi: 10.1016/j.ypmed.2012.04.016.
2. Cararo JH, Rico EP. Long-lasting implications of embryonic exposure to alcohol: Insights from zebrafish research. *Developmental neurobiology*. 2022;82(1):29-40.doi: 10.1002/dneu.22855.
3. Glantz MD, Bharat C, Degenhardt L, Sampson NA, Scott KM, Lim CCW, et al. The epidemiology of alcohol use disorders cross-nationally: Findings from the World Mental Health Surveys. *Addictive behaviors*. 2020;102:106128.doi: 10.1016/j.addbeh.2019.106128.
4. Coutinho ES, Bahia L, Barufaldi LA, Abreu Gde A, Malhão TA, Pepe CR, et al. Cost of diseases related to alcohol consumption in the Brazilian Unified Health System. *Revista de saude publica*. 2016;50.doi: 10.1590/s1518-8787.2016050005741.
5. Tirapelli LF, Martins-Oliveira A, Batalhão ME, Tirapelli DP, Carnio EC, Tanus-Santos JE, et al. Ethanol consumption increases the expression of endothelial nitric oxide synthase, inducible nitric oxide synthase and metalloproteinases in the rat kidney. *The Journal of pharmacy and pharmacology*. 2012;64(1):68-76.doi: 10.1111/j.2042-7158.2011.01396.x.
6. Lian C. L'alcoolisme, cause d'hypertension arterielle. . *Acad Natl Med*. 1915;74::525-28.
7. McMahan RH, Anton P, Coleman LG, Jr., Cresci GAM, Crews FT, Crotty KM, et al. Alcohol and Immunology: Mechanisms of Multi-Organ Damage. Summary of the 2022 Alcohol and Immunology Research Interest Group (AIRIG) meeting. *Alcohol (Fayetteville, NY)*. 2023.doi: 10.1016/j.alcohol.2023.04.002.
8. MacMahon S. Alcohol consumption and hypertension. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)*. 1987;9(2):111-21.doi: 10.1161/01.hyp.9.2.111.
9. Klatsky AL, Friedman GD, Siegelau AB, Gérard MJ. Alcohol consumption and blood pressure. Kaiser-Permanente Multiphasic Health Examination data. *The New England journal of medicine*. 1977;296(21):1194-200.doi: 10.1056/nejm197705262962103.
10. Milon H, Froment A, Gaspard P, Guidollet J, Ripoll JP. Alcohol consumption and blood pressure in a French epidemiological study. *European heart journal*. 1982;3 Suppl C:59-64.doi: 10.1093/eurheartj/3.suppl_c.59.
11. Klatsky AL, Friedman GD, Armstrong MA. The relationships between alcoholic beverage use and other traits to blood pressure: a new Kaiser Permanente study. *Circulation*. 1986;73(4):628-36.doi: 10.1161/01.cir.73.4.628.
12. Vander AJ. Chronic effects of lead on the renin-angiotensin system. *Environmental health perspectives*. 1988;78:77-83.doi: 10.1289/ehp.887877.
13. Fuchs FD, Chambless LE, Whelton PK, Nieto FJ, Heiss G. Alcohol consumption and the incidence of hypertension: The Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)*. 2001;37(5):1242-50.doi: 10.1161/01.hyp.37.5.1242.
14. Skliros EA, Papadodima SA, Sotiropoulos A, Xipnitos C, Kollias A, Spiliopoulou CA. Relationship between alcohol consumption and control of hypertension among elderly Greeks. *The Nemea primary care study*. *Hellenic journal of cardiology : HJC = Hellenike kardiologike epitheorese*. 2012;53(1):26-32.
15. Unger T, Borghi C, Charchar F, Khan NA, Poulter NR, Prabhakaran D, et al. 2020 International Society of Hypertension Global Hypertension Practice Guidelines. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)*. 2020;75(6):1334-57.doi: 10.1161/hypertensionaha.120.15026.
16. Williams B, Mancia G, Spiering W, Agabiti Rosei E, Azizi M, Burnier M, et al. 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension. *European heart journal*. 2018;39(33):3021-104.doi: 10.1093/eurheartj/ehy339.
17. Whelton PK, Carey RM, Aronow WS, Casey DE, Jr., Collins KJ, Dennison Himmelfarb C, et al. 2017 ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Journal of the American College of Cardiology*. 2018;71(19):e127-e248.doi: 10.1016/j.jacc.2017.11.006.
18. Rehm J, Baliunas D, Borges GL, Graham K, Irving H, Kehoe T, et al. The relation between different dimensions of alcohol consumption and burden of disease: an overview. *Addiction (Abingdon, England)*. 2010;105(5):817-43.doi: 10.1111/j.1360-0443.2010.02899.x.
19. Fernández-Solà J. Cardiovascular risks and benefits of moderate and heavy alcohol consumption. *Nature reviews Cardiology*. 2015;12(10):576-87.doi: 10.1038/nrcardio.2015.91.
20. Drinking Patterns and Their Definitions. *Alcohol research : current reviews*. 2018;39(1):17-8.
21. Marchi KC, Muniz JJ, Tirapelli CR. Hypertension and chronic ethanol consumption: What do we know after a century of study? *World journal of cardiology*. 2014;6(5):283-94.doi: 10.4330/wjc.v6.i5.283.

22. Pinardi G, Brieva C, Vinet R, Penna M. Effects of chronic ethanol consumption on alpha-adrenergic-induced contractions in rat thoracic aorta. *General pharmacology*. 1992;23(2):245-8.doi: 10.1016/0306-3623(92)90019-g.
23. Hatton DC, Bukoski RD, Edgar S, McCarron DA. Chronic alcohol consumption lowers blood pressure but enhances vascular contractility in Wistar rats. *Journal of hypertension*. 1992;10(6):529-37.doi: 10.1097/00004872-199206000-00005.
24. Stewart CW, Kennedy RH. Effects of chronic ethanol consumption on aortic constriction in male and female rats. *European journal of pharmacology*. 1999;366(1):55-60.doi: 10.1016/s0014-2999(98)00900-5.
25. Ladipo CO, Adigun SA, Nwaigwe CI, Adegunloye BJ. Chronic ethanol consumption alters vascular smooth muscle responses in rats. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*. 2002;29(8):707-9.doi: 10.1046/j.1440-1681.2002.03721.x.
26. Resstel LB, Tirapelli CR, Lanchote VL, Uyemura SA, de Oliveira AM, Corrêa FM. Chronic ethanol consumption alters cardiovascular functions in conscious rats. *Life sciences*. 2006;78(19):2179-87.doi: 10.1016/j.lfs.2005.09.021.
27. Passaglia P, Ceron CS, Mecawi AS, Antunes-Rodrigues J, Coelho EB, Tirapelli CR. Angiotensin type 1 receptor mediates chronic ethanol consumption-induced hypertension and vascular oxidative stress. *Vascular pharmacology*. 2015;74:49-59.doi: 10.1016/j.vph.2015.04.002.
28. Nieminen MM, Fyhrquist F, Linkola J, Tikkanen I, Tontti K. Renin-aldosterone axis in ethanol intoxication. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*. 1981;15(6):879-82.doi: 10.1016/0091-3057(81)90047-2.
29. Da Silva AL, Ruginsk SG, Uchoa ET, Crestani CC, Scopinho AA, Correa FM, et al. Time-course of neuroendocrine changes and its correlation with hypertension induced by ethanol consumption. *Alcohol and alcoholism (Oxford, Oxfordshire)*. 2013;48(4):495-504.doi: 10.1093/alcalc/agt040.
30. do Vale GT, Simplicio JA, Gonzaga NA, Yokota R, Ribeiro AA, Casarini DE, et al. Nebivolol prevents vascular oxidative stress and hypertension in rats chronically treated with ethanol. *Atherosclerosis*. 2018;274:67-76.doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2018.04.041.
31. Touyz RM, Schiffrin EL. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacological reviews*. 2000;52(4):639-72.
32. Carey RM. Newly discovered components and actions of the renin-angiotensin system. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)*. 2013;62(5):818-22.doi: 10.1161/hypertensionaha.113.01111.
33. Linkola J, Fyhrquist F, Ylikahri R. Renin, aldosterone and cortisol during ethanol intoxication and hangover. *Acta physiologica Scandinavica*. 1979;106(1):75-82.doi: 10.1111/j.1748-1716.1979.tb06372.x.
34. Wong PC, Timmermans PB. Historical development of losartan (DuP 753) and angiotensin II receptor subtypes. *Blood pressure Supplement*. 1996;3:11-4.
35. Wong PY, Carroll RE, Lipinski TL, Capone RR. Studies on the renin-angiotensin-aldosterone system in patients with cirrhosis and ascites: effect of saline and albumin infusion. *Gastroenterology*. 1979;77(6):1171-6.
36. Husain K, Vazquez M, Ansari RA, Malafa MP, Lalla J. Chronic alcohol-induced oxidative endothelial injury relates to angiotensin II levels in the rat. *Molecular and cellular biochemistry*. 2008;307(1-2):51-8.doi: 10.1007/s11010-007-9583-6.
37. Wright JW, Morseth SL, Abhold RH, Harding JW. Elevations in plasma angiotensin II with prolonged ethanol treatment in rats. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*. 1986;24(4):813-8.doi: 10.1016/0091-3057(86)90416-8.
38. Okamura T, Miyazaki M, Inagami T, Toda N. Vascular renin-angiotensin system in two-kidney, one clip hypertensive rats. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)*. 1986;8(7):560-5.doi: 10.1161/01.hyp.8.7.560.
39. Zafari AM, Ushio-Fukai M, Akers M, Yin Q, Shah A, Harrison DG, et al. Role of NADH/NADPH oxidase-derived H₂O₂ in angiotensin II-induced vascular hypertrophy. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)*. 1998;32(3):488-95.doi: 10.1161/01.hyp.32.3.488.
40. Luther JM, Brown NJ. The renin-angiotensin-aldosterone system and glucose homeostasis. *Trends Pharmacol Sci*. 2011;32(12):734-9.doi: 10.1016/j.tips.2011.07.006.
41. Ceron CS, do Vale GT, Simplicio JA, Passaglia P, Ricci ST, Tirapelli CR. Data on the effects of losartan on protein expression, vascular reactivity and antioxidant capacity in the aorta of ethanol-treated rats. *Data in brief*. 2017;11:111-6.doi: 10.1016/j.dib.2017.01.006.
42. Sedeek M, Nasrallah R, Touyz RM, Hébert RL. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and the kidney: friend and foe. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2013;24(10):1512-8.doi: 10.1681/asn.2012111112.
43. Rodiño-Janeiro BK, Paradela-Dobarro B, Castiñeiras-Landeira MI, Raposeiras-Roubín S, González-Juanatey JR, Alvarez E. Current status of NADPH oxidase research in cardiovascular pharmacology. *Vascular health and risk management*. 2013;9:401-28.doi: 10.2147/vhrm.S33053.
44. Dworakowski R, Alom-Ruiz SP, Shah AM. NADPH oxidase-derived reactive oxygen species in the regulation of endothelial phenotype. *Pharmacological reports : PR*. 2008;60(1):21-8.

45. Drummond GR, Selemidis S, Griendling KK, Sobey CG. Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov.* 2011;10(6):453-71.doi: 10.1038/nrd3403.
46. Lambeth JD, Kawahara T, Diebold B. Regulation of Nox and Duox enzymatic activity and expression. *Free radical biology & medicine.* 2007;43(3):319-31.doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.03.028.
47. Park Y, Yang J, Zhang H, Chen X, Zhang C. Effect of PAR2 in regulating TNF- α and NAD(P)H oxidase in coronary arterioles in type 2 diabetic mice. *Basic research in cardiology.* 2011;106(1):111-23.doi: 10.1007/s00395-010-0129-9.
48. Sun H, Mayhan WG. Temporal effect of alcohol consumption on reactivity of pial arterioles: role of oxygen radicals. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology.* 2001;280(3):H992-h1001.doi: 10.1152/ajpheart.2001.280.3.H992.
49. Husain K, Mejia J, Lalla J, Kazim S. Time response of alcohol-induced alterations in blood pressure, nitric oxide and oxidant to antioxidant balance in the plasma of rats. *Experimental and clinical cardiology.* 2004;9(4):229-34.
50. Husain K, Scott BR, Reddy SK, Somani SM. Chronic ethanol and nicotine interaction on rat tissue antioxidant defense system. *Alcohol (Fayetteville, NY).* 2001;25(2):89-97.doi: 10.1016/s0741-8329(01)00176-8.
51. Marchi KC, Ceron CS, Muniz JJ, De Martinis BS, Tanus-Santos JE, Tirapelli CR. NADPH Oxidase Plays a Role on Ethanol-Induced Hypertension and Reactive Oxygen Species Generation in the Vasculature. *Alcohol and alcoholism (Oxford, Oxfordshire).* 2016;51(5):522-34.doi: 10.1093/alcalc/aggw043.
52. Tousoulis D, Simopoulou C, Papageorgiou N, Oikonomou E, Hatzis G, Siasos G, et al. Endothelial dysfunction in conduit arteries and in microcirculation. Novel therapeutic approaches. *Pharmacol Ther.* 2014;144(3):253-67.doi: 10.1016/j.pharmthera.2014.06.003.
53. Griendling KK, FitzGerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation.* 2003;108(16):1912-6.doi: 10.1161/01.Cir.0000093660.86242.Bb.
54. Rubanyi GM, Vanhoutte PM. Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *The American journal of physiology.* 1986;250(5 Pt 2):H822-7.doi: 10.1152/ajpheart.1986.250.5.H822.
55. Boucher JL, Moali C, Tenu JP. Nitric oxide biosynthesis, nitric oxide synthase inhibitors and arginase competition for L-arginine utilization. *Cellular and molecular life sciences : CMLS.* 1999;55(8-9):1015-28.doi: 10.1007/s000180050352.
56. Tirapelli CR, Fukada SY, Yogi A, Chignalia AZ, Tostes RC, Bonaventura D, et al. Gender-specific vascular effects elicited by chronic ethanol consumption in rats: a role for inducible nitric oxide synthase. *British journal of pharmacology.* 2008;153(3):468-79.doi: 10.1038/sj.bjp.0707589.
57. Toda N, Ayajiki K. Vascular actions of nitric oxide as affected by exposure to alcohol. *Alcohol and alcoholism (Oxford, Oxfordshire).* 2010;45(4):347-55.doi: 10.1093/alcalc/agg028.
58. Gao YJ, Lu C, Su LY, Sharma AM, Lee RM. Modulation of vascular function by perivascular adipose tissue: the role of endothelium and hydrogen peroxide. *British journal of pharmacology.* 2007;151(3):323-31.doi: 10.1038/sj.bjp.0707228.
59. Cinti S. The adipose organ: morphological perspectives of adipose tissues. *The Proceedings of the Nutrition Society.* 2001;60(3):319-28.doi: 10.1079/pns200192.
60. Szasz T, Webb RC. Perivascular adipose tissue: more than just structural support. *Clinical science (London, England : 1979).* 2012;122(1):1-12.doi: 10.1042/cs20110151.
61. Boydens C, Maenhaut N, Pauwels B, Decaluwé K, Van de Voorde J. Adipose tissue as regulator of vascular tone. *Current hypertension reports.* 2012;14(3):270-8.doi: 10.1007/s11906-012-0259-6.
62. Cheng CK, Bakar HA, Gollasch M, Huang Y. Perivascular Adipose Tissue: the Sixth Man of the Cardiovascular System. *Cardiovascular drugs and therapy.* 2018;32(5):481-502.doi: 10.1007/s10557-018-6820-z.
63. Nosalski R, Guzik TJ. Perivascular adipose tissue inflammation in vascular disease. *British journal of pharmacology.* 2017;174(20):3496-513.doi: 10.1111/bph.13705.
64. Brown NK, Zhou Z, Zhang J, Zeng R, Wu J, Eitzman DT, et al. Perivascular adipose tissue in vascular function and disease: a review of current research and animal models. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* 2014;34(8):1621-30.doi: 10.1161/atvbaha.114.303029.
65. Cheng CK, Ding H, Jiang M, Yin H, Gollasch M, Huang Y. Perivascular adipose tissue: Fine-tuner of vascular redox status and inflammation. *Redox biology.* 2023;62:102683.doi: 10.1016/j.redox.2023.102683.
66. Watts SW, Gollasch M. Editorial: Perivascular Adipose Tissue (PVAT) in Health and Disease. *Frontiers in physiology.* 2018;9:1004.doi: 10.3389/fphys.2018.01004.
67. Soltis EE, Cassis LA. Influence of perivascular adipose tissue on rat aortic smooth muscle responsiveness. *Clinical and experimental hypertension Part A, Theory and practice.* 1991;13(2):277-96.doi: 10.3109/10641969109042063.

68. Löhn M, Dubrovská G, Lauterbach B, Luft FC, Gollasch M, Sharma AM. Periadventitial fat releases a vascular relaxing factor. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2002;16(9):1057-63.doi: 10.1096/fj.02-0024com.
69. Xia N, Horke S, Habermeier A, Closs EI, Reifenberg G, Gericke A, et al. Uncoupling of Endothelial Nitric Oxide Synthase in Perivascular Adipose Tissue of Diet-Induced Obese Mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2016;36(1):78-85.doi: 10.1161/atvbaha.115.306263.
70. Fang L, Zhao J, Chen Y, Ma T, Xu G, Tang C, et al. Hydrogen sulfide derived from periadventitial adipose tissue is a vasodilator. *Journal of hypertension*. 2009;27(11):2174-85.doi: 10.1097/HJH.0b013e328330a900.
71. Gonzaga NA, Awata WMC, do Vale GT, Marchi KC, Muniz JJ, Tanus-Santos JE, et al. Perivascular adipose tissue protects against the vascular dysfunction induced by acute ethanol intake: Role of hydrogen peroxide. *Vascular pharmacology*. 2018;111:44-53.doi: 10.1016/j.vph.2018.08.010.
72. Awata WMC, Gonzaga NA, Borges VF, Silva CBP, Tanus-Santos JE, Cunha FQ, et al. Perivascular adipose tissue contributes to lethal sepsis-induced vasoplegia in rats. *European journal of pharmacology*. 2019;863:172706.doi: 10.1016/j.ejphar.2019.172706.
73. Fésüs G, Dubrovská G, Gorzelniak K, Kluge R, Huang Y, Luft FC, et al. Adiponectin is a novel humoral vasodilator. *Cardiovascular research*. 2007;75(4):719-27.doi: 10.1016/j.cardiores.2007.05.025.
74. Gálvez-Prieto B, Somoza B, Gil-Ortega M, García-Prieto CF, de Las Heras AI, González MC, et al. Anticontractile Effect of Perivascular Adipose Tissue and Leptin are Reduced in Hypertension. *Frontiers in pharmacology*. 2012;3:103.doi: 10.3389/fphar.2012.00103.
75. Small HY, McNeilly S, Mary S, Sheikh AM, Delles C. Resistin Mediates Sex-Dependent Effects of Perivascular Adipose Tissue on Vascular Function in the Shrsp. *Scientific reports*. 2019;9(1):6897.doi: 10.1038/s41598-019-43326-z.
76. Ozen G, Topal G, Gomez I, Ghorreshi A, Boukais K, Benyahia C, et al. Control of human vascular tone by prostanoids derived from perivascular adipose tissue. *Prostaglandins & other lipid mediators*. 2013;107:13-7.doi: 10.1016/j.prostaglandins.2013.06.002.
77. Lee RM, Bader M, Alenina N, Santos RA, Gao YJ, Lu C. Mas receptors in modulating relaxation induced by perivascular adipose tissue. *Life sciences*. 2011;89(13-14):467-72.doi: 10.1016/j.lfs.2011.07.016.
78. Lee RM, Lu C, Su LY, Gao YJ. Endothelium-dependent relaxation factor released by perivascular adipose tissue. *Journal of hypertension*. 2009;27(4):782-90.doi: 10.1097/HJH.0b013e328324ed86.
79. Rajshaker S, Manka D, Blomkalns AL, Chatterjee TK, Stoll LL, Weintraub NL. Crosstalk between perivascular adipose tissue and blood vessels. *Current opinion in pharmacology*. 2010;10(2):191-6.doi: 10.1016/j.coph.2009.11.005.
80. Ayala-Lopez N, Martini M, Jackson WF, Darios E, Burnett R, Seitz B, et al. Perivascular adipose tissue contains functional catecholamines. *Pharmacology research & perspectives*. 2014;2(3):e00041.doi: 10.1002/prp2.41.
81. Hai-Mei L, Song-Yin H, Run-Mei L, Xiao-Huang X, Le-Quan Z, Xiao-Ping L, et al. Andrographolide protects against lipopolysaccharide-induced vascular hyporeactivity by suppressing the expression of inducible nitric oxide in periaortic adipose. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2013;62(2):154-9.doi: 10.1097/FJC.0b013e31829497ea.
82. da Costa RM, Fais RS, Dechandt CRP, Louzada-Junior P, Alberici LC, Lobato NS, et al. Increased mitochondrial ROS generation mediates the loss of the anti-contractile effects of perivascular adipose tissue in high-fat diet obese mice. *British journal of pharmacology*. 2017;174(20):3527-41.doi: 10.1111/bph.13687.
83. Lian X, Gollasch M. A Clinical Perspective: Contribution of Dysfunctional Perivascular Adipose Tissue (PVAT) to Cardiovascular Risk. *Current hypertension reports*. 2016;18(11):82.doi: 10.1007/s11906-016-0692-z.
84. Xia N, Li H. The role of perivascular adipose tissue in obesity-induced vascular dysfunction. *British journal of pharmacology*. 2017;174(20):3425-42.doi: 10.1111/bph.13650.
85. Greenstein AS, Khavandi K, Withers SB, Sonoyama K, Clancy O, Jeziorska M, et al. Local inflammation and hypoxia abolish the protective anticontractile properties of perivascular fat in obese patients. *Circulation*. 2009;119(12):1661-70.doi: 10.1161/circulationaha.108.821181.
86. Ketonen J, Shi J, Martonen E, Mervaala E. Periadventitial adipose tissue promotes endothelial dysfunction via oxidative stress in diet-induced obese C57Bl/6 mice. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society*. 2010;74(7):1479-87.doi: 10.1253/circj.cj-09-0661.
87. Guzik TJ, Olszanecki R, Sadowski J, Kapelak B, Rudziński P, Jopek A, et al. Superoxide dismutase activity and expression in human venous and arterial bypass graft vessels. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society*. 2005;56(2):313-23.
88. Szasz T, Bomfim GF, Webb RC. The influence of perivascular adipose tissue on vascular homeostasis. *Vascular health and risk management*. 2013;9:105-16.doi: 10.2147/vhrm.S33760.
89. Even SE, Dulak-Lis MG, Touyz RM, Nguyen Dinh Cat A. Crosstalk between adipose tissue and blood vessels in cardiometabolic syndrome: implication of steroid hormone receptors (MR/GR). *Hormone molecular biology and clinical investigation*. 2014;19(2):89-101.doi: 10.1515/hmbci-2014-0013.

90. Mikolajczyk TP, Nosalski R, Szczepaniak P, Budzyn K, Osmenda G, Skiba D, et al. Role of chemokine RANTES in the regulation of perivascular inflammation, T-cell accumulation, and vascular dysfunction in hypertension. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2016;30(5):1987-99.doi: 10.1096/fj.201500088R.
91. Nguyen Dinh Cat A, Briones AM, Callera GE, Yogi A, He Y, Montezano AC, et al. Adipocyte-derived factors regulate vascular smooth muscle cells through mineralocorticoid and glucocorticoid receptors. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)*. 2011;58(3):479-88.doi: 10.1161/hypertensionaha.110.168872.
92. Saleh MA, McMaster WG, Wu J, Norlander AE, Funt SA, Thabet SR, et al. Lymphocyte adaptor protein LNK deficiency exacerbates hypertension and end-organ inflammation. *J Clin Invest*. 2015;125(3):1189-202.doi: 10.1172/jci76327.
93. Sakaue T, Suzuki J, Hamaguchi M, Suehiro C, Tanino A, Nagao T, et al. Perivascular Adipose Tissue Angiotensin II Type 1 Receptor Promotes Vascular Inflammation and Aneurysm Formation. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)*. 2017;70(4):780-9.doi: 10.1161/hypertensionaha.117.09512.
94. Ye M, Ruan CC, Fu M, Xu L, Chen D, Zhu M, et al. Developmental and functional characteristics of the thoracic aorta perivascular adipocyte. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2019;76(4):777-89.doi: 10.1007/s00018-018-2970-1.
95. Kagota S, Maruyama-Fumoto K, Iwata S, Shimari M, Koyanagi S, Shiokawa Y, et al. Perivascular Adipose Tissue-Enhanced Vasodilation in Metabolic Syndrome Rats by Apelin and N-Acetyl-l-Cysteine-Sensitive Factor(s). *International journal of molecular sciences*. 2018;20(1).doi: 10.3390/ijms20010106.
96. Török J, Zemančíková A, Kocianová Z. Interaction of perivascular adipose tissue and sympathetic nerves in arteries from normotensive and hypertensive rats. *Physiological research*. 2016;65(Suppl 3):S391-s9.doi: 10.33549/physiolres.933434.
97. Simplicio JA, Gonzaga NA, Nakashima MA, De Martinis BS, Cunha TM, Tirapelli LF, et al. Tumor necrosis factor- α receptor 1 contributes to ethanol-induced vascular reactive oxygen species generation and hypertension. *Journal of the American Society of Hypertension : JASH*. 2017;11(10):684-96.e3.doi: 10.1016/j.jash.2017.07.008.
98. Simplicio JA, Dourado TMH, Awata WMC, do Vale GT, Dias VR, Barros PR, et al. Ethanol consumption favors pro-contractile phenotype of perivascular adipose tissue: A role for interleukin-6. *Life sciences*. 2023;319:121526.doi: 10.1016/j.lfs.2023.121526.
99. Park IU, Taylor AL. Race and ethnicity in trials of antihypertensive therapy to prevent cardiovascular outcomes: a systematic review. *Annals of family medicine*. 2007;5(5):444-52.doi: 10.1370/afm.708.
100. Simão AF, Precoma DB, Andrade JP, Correa FH, Saraiva JF, Oliveira GM, et al. [I Brazilian Guidelines for cardiovascular prevention]. *Arquivos brasileiros de cardiologia*. 2013;101(6 Suppl 2):1-63.doi: 10.5935/abc.2013S012.
101. Mann JF, Schmieder RE, McQueen M, Dyal L, Schumacher H, Pogue J, et al. Renal outcomes with telmisartan, ramipril, or both, in people at high vascular risk (the ONTARGET study): a multicentre, randomised, double-blind, controlled trial. *Lancet (London, England)*. 2008;372(9638):547-53.doi: 10.1016/s0140-6736(08)61236-2.
102. Tirapelli CR, Casolari DA, Montezano AC, Yogi A, Tostes RC, Legros E, et al. Ethanol consumption enhances endothelin-1-induced contraction in the isolated rat carotid. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2006;318(2):819-27.doi: 10.1124/jpet.106.103010.
103. Dourado TMH, Assis VO, Awata WMC, de Mello MMB, Cárnio EC, Castro MM, et al. Mineralocorticoid receptors contribute to ethanol-induced vascular hypercontractility through reactive oxygen species generation and up-regulation of cyclooxygenase 2. *European journal of pharmacology*. 2023;949:175723.doi: 10.1016/j.ejphar.2023.175723.
104. Urso T, Gavaler JS, Van Thiel DH. Blood ethanol levels in sober alcohol users seen in an emergency room. *Life sciences*. 1981;28(9):1053-6.doi: 10.1016/0024-3205(81)90752-9.
105. Dal-Ros S, Zoll J, Lang AL, Auger C, Keller N, Bronner C, et al. Chronic intake of red wine polyphenols by young rats prevents aging-induced endothelial dysfunction and decline in physical performance: role of NADPH oxidase. *Biochemical and biophysical research communications*. 2011;404(2):743-9.doi: 10.1016/j.bbrc.2010.12.060.
106. Huang A, Yan C, Suematsu N, Cuevas A, Yang YM, Kertowidjojo E, et al. Impaired flow-induced dilation of coronary arterioles of dogs fed a low-salt diet: roles of ANG II, PKC, and NAD(P)H oxidase. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2010;299(5):H1476-83.doi: 10.1152/ajpheart.01250.2009.
107. Sleem M, Taye A, El-Moselhy MA, Mangoura SA. Combination therapy with losartan and L-carnitine protects against endothelial dysfunction of streptozotocin-induced diabetic rats. *European journal of pharmacology*. 2014;744:10-7.doi: 10.1016/j.ejphar.2014.09.032.
108. Hornig B, Landmesser U, Kohler C, Ahlersmann D, Spiekermann S, Christoph A, et al. Comparative effect of ace inhibition and angiotensin II type 1 receptor antagonism on bioavailability of nitric oxide in patients with coronary artery disease: role of superoxide dismutase. *Circulation*. 2001;103(6):799-805.doi: 10.1161/01.cir.103.6.799.

109. Leite LN, Gonzaga NA, Simplicio JA, do Vale GT, Carballido JM, Alves-Filho JC, et al. Pharmacological characterization of the mechanisms underlying the vascular effects of succinate. *European journal of pharmacology*. 2016;789:334-43.doi: 10.1016/j.ejphar.2016.07.045.
110. Lee RM, Ding L, Lu C, Su LY, Gao YJ. Alteration of perivascular adipose tissue function in angiotensin II-induced hypertension. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 2009;87(11):944-53.doi: 10.1139/y09-088.
111. Yogi A, Callera GE, Hipólito UV, Silva CR, Touyz RM, Tirapelli CR. Ethanol-induced vasoconstriction is mediated via redox-sensitive cyclo-oxygenase-dependent mechanisms. *Clinical science (London, England : 1979)*. 2010;118(11):657-68.doi: 10.1042/cs20090352.
112. Gonzaga NA, Awata WMC, Ficher SP, Assis VO, Alves JV, Tostes RC, et al. Melatonin reverses the loss of the anticontractile effect of perivascular adipose tissue in obese rats. *Journal of pineal research*. 2021;70(2):e12710.doi: 10.1111/jpi.12710.
113. Chang L, Villacorta L, Li R, Hamblin M, Xu W, Dou C, et al. Loss of perivascular adipose tissue on peroxisome proliferator-activated receptor- γ deletion in smooth muscle cells impairs intravascular thermoregulation and enhances atherosclerosis. *Circulation*. 2012;126(9):1067-78.doi: 10.1161/circulationaha.112.104489.
114. Man AWC, Zhou Y, Xia N, Li H. Perivascular Adipose Tissue Oxidative Stress in Obesity. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*. 2023;12(8).doi: 10.3390/antiox12081595.
115. Baud O, Greene AE, Li J, Wang H, Volpe JJ, Rosenberg PA. Glutathione peroxidase-catalase cooperativity is required for resistance to hydrogen peroxide by mature rat oligodendrocytes. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2004;24(7):1531-40.doi: 10.1523/jneurosci.3989-03.2004.
116. Larue-Achagiotis C, Poussard AM, Louis-Sylvestre J. Alcohol drinking, food and fluid intakes and body weight gain in rats. *Physiology & behavior*. 1990;47(3):545-8.doi: 10.1016/0031-9384(90)90124-m.
117. Molina PE, Hoek JB, Nelson S, Guidot DM, Lang CH, Wands JR, et al. Mechanisms of alcohol-induced tissue injury. *Alcoholism, clinical and experimental research*. 2003;27(3):563-75.doi: 10.1097/01.Alc.0000057946.57330.F7.
118. Butts M, Sundaram VL, Murughiyan U, Borthakur A, Singh S. The Influence of Alcohol Consumption on Intestinal Nutrient Absorption: A Comprehensive Review. *Nutrients*. 2023;15(7).doi: 10.3390/nu15071571.
119. do Vale GT, da Silva CBP, Sousa AH, Gonzaga NA, Parente JM, Araújo KM, et al. Nebivolol Prevents Up-Regulation of Nox2/NADPH Oxidase and Lipoperoxidation in the Early Stages of Ethanol-Induced Cardiac Toxicity. *Cardiovascular toxicology*. 2021;21(3):224-35.doi: 10.1007/s12012-020-09614-1.
120. Tirapelli CR, Leone AF, Coelho EB, Resstel LB, Corrêa FM, Lanchote VL, et al. Effect of ethanol consumption on blood pressure and rat mesenteric arterial bed, aorta and carotid responsiveness. *The Journal of pharmacy and pharmacology*. 2007;59(7):985-93.doi: 10.1211/jpp.59.7.0011.
121. Anton AH. ETHANOL AND URINARY CATECHOLAMINES IN MAN. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 1965;6:462-9.doi: 10.1002/cpt196564462.
122. Davis VE, Brown H, Huff JA, Cashaw JL. Ethanol-induced alterations of norepinephrine metabolism in man. *The Journal of laboratory and clinical medicine*. 1967;69(5):787-99.
123. Thomas P, Dasgupta I. The role of the kidney and the sympathetic nervous system in hypertension. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)*. 2015;30(4):549-60.doi: 10.1007/s00467-014-2789-4.
124. Ebert TJ, Stowe DF. Neural and endothelial control of the peripheral circulation--implications for anesthesia: Part I. Neural control of the peripheral vasculature. *Journal of cardiothoracic and vascular anesthesia*. 1996;10(1):147-58.doi: 10.1016/s1053-0770(96)80190-x.
125. Barp CG, Bonaventura D, Assrey J. NO, ROS, RAS, and PVAT: More Than a Soup of Letters. *Frontiers in physiology*. 2021;12:640021.doi: 10.3389/fphys.2021.640021.
126. Gálvez-Prieto B, Bolbrinker J, Stucchi P, de Las Heras AI, Merino B, Arribas S, et al. Comparative expression analysis of the renin-angiotensin system components between white and brown perivascular adipose tissue. *The Journal of endocrinology*. 2008;197(1):55-64.doi: 10.1677/joe-07-0284.
127. Lee MH, Song HK, Ko GJ, Kang YS, Han SY, Han KH, et al. Angiotensin receptor blockers improve insulin resistance in type 2 diabetic rats by modulating adipose tissue. *Kidney international*. 2008;74(7):890-900.doi: 10.1038/ki.2008.313.
128. Vecchione C, Maffei A, Colella S, Aretini A, Poulet R, Frati G, et al. Leptin effect on endothelial nitric oxide is mediated through Akt-endothelial nitric oxide synthase phosphorylation pathway. *Diabetes*. 2002;51(1):168-73.doi: 10.2337/diabetes.51.1.168.
129. Chen H, Montagnani M, Funahashi T, Shimomura I, Quon MJ. Adiponectin stimulates production of nitric oxide in vascular endothelial cells. *J Biol Chem*. 2003;278(45):45021-6.doi: 10.1074/jbc.M307878200.
130. Lynch FM, Withers SB, Yao Z, Werner ME, Edwards G, Weston AH, et al. Perivascular adipose tissue-derived adiponectin activates BK(Ca) channels to induce anticontractile responses. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2013;304(6):H786-95.doi: 10.1152/ajpheart.00697.2012.

131. Santos SH, Braga JF, Mario EG, Pôrto LC, Rodrigues-Machado Mda G, Murari A, et al. Improved lipid and glucose metabolism in transgenic rats with increased circulating angiotensin-(1-7). *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2010;30(5):953-61. doi: 10.1161/atvbaha.109.200493.
132. Gil-Ortega M, Condezo-Hoyos L, García-Prieto CF, Arribas SM, González MC, Aranguéz I, et al. Imbalance between pro and anti-oxidant mechanisms in perivascular adipose tissue aggravates long-term high-fat diet-derived endothelial dysfunction. *PLoS One*. 2014;9(4):e95312. doi: 10.1371/journal.pone.0095312.
133. Lu C, Su LY, Lee RM, Gao YJ. Alterations in perivascular adipose tissue structure and function in hypertension. *European journal of pharmacology*. 2011;656(1-3):68-73. doi: 10.1016/j.ejphar.2011.01.023.
134. Kangussu LM, Guimaraes PS, Nadu AP, Melo MB, Santos RA, Campagnole-Santos MJ. Activation of angiotensin-(1-7)/Mas axis in the brain lowers blood pressure and attenuates cardiac remodeling in hypertensive transgenic (mRen2)27 rats. *Neuropharmacology*. 2015;97:58-66. doi: 10.1016/j.neuropharm.2015.04.036.
135. Kostenis E, Milligan G, Christopoulos A, Sanchez-Ferrer CF, Heringer-Walther S, Sexton PM, et al. G-protein-coupled receptor Mas is a physiological antagonist of the angiotensin II type 1 receptor. *Circulation*. 2005;111(14):1806-13. doi: 10.1161/01.Cir.0000160867.23556.7d.
136. Polizio AH, Gironacci MM, Tomaro ML, Peña C. Angiotensin-(1-7) blocks the angiotensin II-stimulated superoxide production. *Pharmacological research*. 2007;56(1):86-90. doi: 10.1016/j.phrs.2007.04.004.
137. Ahmed A, Bibi A, Valoti M, Fusi F. Perivascular Adipose Tissue and Vascular Smooth Muscle Tone: Friends or Foes? *Cells*. 2023;12(8). doi: 10.3390/cells12081196.
138. Hug C, Lodish HF. The role of the adipocyte hormone adiponectin in cardiovascular disease. *Current opinion in pharmacology*. 2005;5(2):129-34. doi: 10.1016/j.coph.2005.01.001.
139. Menzaghi C, Trischitta V, Doria A. Genetic influences of adiponectin on insulin resistance, type 2 diabetes, and cardiovascular disease. *Diabetes*. 2007;56(5):1198-209. doi: 10.2337/db06-0506.
140. Kawai T, Ohishi M, Takeya Y, Onishi M, Ito N, Yamamoto K, et al. Adiponectin single nucleotide polymorphism is a genetic risk factor for stroke through high pulse wave pressure: a cohort study. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*. 2013;20(2):152-60. doi: 10.5551/jat.14696.
141. Suzuki H, Eguchi S. Adiponectin versus angiotensin II: Key pathological role of their misbalance. *Kidney international*. 2006;70(10):1678-9. doi: 10.1038/sj.ki.5001936.
142. Clasen R, Schupp M, Foryst-Ludwig A, Sprang C, Clemenz M, Krikov M, et al. PPARgamma-activating angiotensin type-1 receptor blockers induce adiponectin. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)*. 2005;46(1):137-43. doi: 10.1161/01.HYP.0000168046.19884.6a.
143. Ohashi K, Ouchi N, Matsuzawa Y. Adiponectin and hypertension. *American journal of hypertension*. 2011;24(3):263-9. doi: 10.1038/ajh.2010.216.
144. Woods AJ, Stock MJ. Leptin activation in hypothalamus. *Nature*. 1996;381(6585):745. doi: 10.1038/381745a0.
145. Bouloumie A, Marumo T, Lafontan M, Busse R. Leptin induces oxidative stress in human endothelial cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1999;13(10):1231-8.
146. Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiological reviews*. 2004;84(1):277-359. doi: 10.1152/physrev.00015.2003.
147. Chang L, Garcia-Barrio MT, Chen YE. Perivascular Adipose Tissue Regulates Vascular Function by Targeting Vascular Smooth Muscle Cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2020;40(5):1094-109. doi: 10.1161/atvbaha.120.312464.
148. Victorio JA, Fontes MT, Rossoni LV, Davel AP. Different Anti-Contractile Function and Nitric Oxide Production of Thoracic and Abdominal Perivascular Adipose Tissues. *Frontiers in physiology*. 2016;7:295. doi: 10.3389/fphys.2016.00295.
149. Li PF, Dietz R, von Harsdorf R. Differential effect of hydrogen peroxide and superoxide anion on apoptosis and proliferation of vascular smooth muscle cells. *Circulation*. 1997;96(10):3602-9. doi: 10.1161/01.cir.96.10.3602.
150. Fontes MT, Paula SM, Lino CA, Senger N, Couto GK, Barreto-Chaves MLM, et al. Renin-angiotensin system overactivation in perivascular adipose tissue contributes to vascular dysfunction in heart failure. *Clinical science (London, England : 1979)*. 2020;134(23):3195-211. doi: 10.1042/cs20201099.
151. Antonopoulos AS, Margaritis M, Coutinho P, Shiroadaria C, Psarros C, Herdman L, et al. Adiponectin as a link between type 2 diabetes and vascular NADPH oxidase activity in the human arterial wall: the regulatory role of perivascular adipose tissue. *Diabetes*. 2015;64(6):2207-19. doi: 10.2337/db14-1011.
152. Margaritis M, Antonopoulos AS, Digby J, Lee R, Reilly S, Coutinho P, et al. Interactions between vascular wall and perivascular adipose tissue reveal novel roles for adiponectin in the regulation of endothelial nitric oxide synthase function in human vessels. *Circulation*. 2013;127(22):2209-21. doi: 10.1161/circulationaha.112.001133.

153. Liu XX, Chen AD, Pan Y, Zhang F, Qi ZB, Cao N, et al. [Angiotensin-(1-7) improves endothelium-dependent vasodilation in rats with monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension]. *Sheng li xue bao* : [Acta physiologica Sinica]. 2023;75(4):497-502.
154. Gil-Longo J, González-Vázquez C. Characterization of four different effects elicited by H₂O₂ in rat aorta. *Vascular pharmacology*. 2005;43(2):128-38.doi: 10.1016/j.vph.2005.06.001.
155. Ardanaz N, Pagano PJ. Hydrogen peroxide as a paracrine vascular mediator: regulation and signaling leading to dysfunction. *Experimental biology and medicine* (Maywood, NJ). 2006;231(3):237-51.doi: 10.1177/153537020623100302.
156. Ramirez JG, O'Malley EJ, Ho WSV. Pro-contractile effects of perivascular fat in health and disease. *British journal of pharmacology*. 2017;174(20):3482-95.doi: 10.1111/bph.13767.
157. Feijóo-Bandín S, Aragón-Herrera A, Moraña-Fernández S, Anido-Varela L, Tarazón E, Roselló-Lletí E, et al. Adipokines and Inflammation: Focus on Cardiovascular Diseases. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(20).doi: 10.3390/ijms21207711.
158. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*. 2009;29(6):313-26.doi: 10.1089/jir.2008.0027.
159. Castoldi A, Naffah de Souza C, Câmara NO, Moraes-Vieira PM. The Macrophage Switch in Obesity Development. *Frontiers in immunology*. 2015;6:637.doi: 10.3389/fimmu.2015.00637.
160. Zhang H, Park Y, Wu J, Chen X, Lee S, Yang J, et al. Role of TNF-alpha in vascular dysfunction. *Clinical science (London, England : 1979)*. 2009;116(3):219-30.doi: 10.1042/cs20080196.
161. Lamaita RM, Pontes A, Belo AV, Caetano JP, Andrade SP, Cândido EB, et al. Evaluation of N-acetylglucosaminidase and myeloperoxidase activity in patients with endometriosis-related infertility undergoing intracytoplasmic sperm injection. *The journal of obstetrics and gynaecology research*. 2012;38(5):810-6.doi: 10.1111/j.1447-0756.2011.01805.x.
162. Leite LN, do Vale GT, Simplicio JA, De Martinis BS, Carneiro FS, Tirapelli CR. 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*. 2017;804:82-93.doi: 10.1016/j.ejphar.2017.03.024.
163. Koduru B, Tejaswini, Thakur A, Kamath SU, Shenoy KR, Kamath U, et al. Indicators of oxidative stress in thyroid cancer. *Indian journal of biochemistry & biophysics*. 2010;47(2):121-3.
164. Xavier DO, Amaral LS, Gomes MA, Rocha MA, Campos PR, Cota BD, et al. Metformin inhibits inflammatory angiogenesis in a murine sponge model. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2010;64(3):220-5.doi: 10.1016/j.biopha.2009.08.004.
165. do Carmo RF, de Almeida DB, Aroucha DC, Vasconcelos LR, de Moraes AC, de Mendonça Cavalcanti Mdo S, et al. Plasma myeloperoxidase levels correlate with hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C. *Human immunology*. 2012;73(11):1127-31.doi: 10.1016/j.humimm.2012.07.322.