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

NATÁLIA DE ALMEIDA GONZAGA

**Efeito da abstinência ao etanol sobre o sistema
renina-angiotensina-aldosterona e a vasculatura**

**Ribeirão Preto
2013**

NATÁLIA DE ALMEIDA GONZAGA

**Efeito da abstinência ao etanol sobre o sistema
renina-angiotensina-aldosterona e a vasculatura**

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

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Carlos Renato Tirapelli

Ribeirão Preto

2013

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

Gonzaga, Natália de Almeida

Avaliação do efeito da abstinência ao etanol sobre o sistema renina-angiotensina-aldosterona e a vasculatura. Ribeirão Preto, 2013.

91 folhas.

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

Orientador: Tirapelli, Carlos Renato.

Sistema renina-angiotensina-aldosterona; abstinência ao etanol; hipertensão; estresse oxidativo.

Nome: Natália de Almeida Gonzaga

Título: Efeito da abstinência ao etanol sobre o sistema renina-angiotensina-aldosterona e a vasculatura

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

Área de concentração: Farmacologia

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Dedico este trabalho à pessoas importantes na minha vida....

À você que sempre esteve ao meu lado pelos caminhos da vida, me acompanhando, me apoiando e principalmente acreditando em mim. Por me fazer enxergar, ter paciência e desejar sonhos maiores. À você meu porto seguro, minha amiga e a razão dos meus dias....

*....dedico à você **Lucélia**, minha mãe querida.*

À senhora pelas orações, pela confiança, pelo carinho, pelo apoio e pela ajuda em momentos importantes da minha vida....

*....dedico à você **Maria (Doca)**, minha avó querida.*

Agradecimentos

À Deus por nunca me faltar e porque eu não seria nada sem a fé que tenho Nele.

Ao Profº Dr. Carlos Renato Tirapelli, primeiramente, obrigada pelo apelido " l " (um linha) dado durante o intervalo de uma aula de bioquímica, pois foi a partir dele, em 2007, que iniciei meu caminho na pesquisa. O interesse era pela farmacologia, mas devido a falta de laboratório naquela época, tive que seguir por outro caminho. Acho que nunca agradeci por ter “aberto” outro caminho e ter me indicado à Cláudia como aluna de iniciação científica, então obrigada! Mas não teve jeito, a vida se encarregou de “arrumar” os caminhos, e o meu caminho era ser sua aluna. E agora depois de quase 6 anos, queria agradecer imensamente por permitir que eu retomasse o meu caminho dentro da farmacologia e pela sábia orientação que tive ao longo deste trabalho. Obrigada pela confiança, pela liberdade de ideias e pelo apoio e incentivo para que eu alcançasse voos mais altos durante o mestrado e que graças a você eu consegui! . Ao querido amigo que fiz, queria agradecer pela preocupação, pelos conselhos, pelo carinho, pela convivência e pela amizade. Enfim, obrigada por me ajudar a trilhar o meu caminho e por permitir que eu continue caminhando durante o doutorado.

À Profª Dra. Cláudia Maria Padovan, minha grande amiga. Obrigada por acreditar em meu potencial de uma forma que as vezes eu acreditava que não fosse capaz de corresponder. Sempre disponível e disposta a ajudar, querendo que eu aproveitasse cada segundo dentro da iniciação científica para absorver todo tipo de conhecimento. Você não foi somente orientadora (antes) e co-orientadora (agora), mas, em alguns momentos, conselheira, confidente, mãe e amiga. Você foi e é referência profissional e pessoal para meu crescimento. Obrigada por me acolher em seu laboratório ainda como aluna de iniciação científica e assim, contribuir diretamente para que eu continuasse a minha graduação. Obrigada por sempre estar ao meu lado e acreditar tanto em mim.

À toda minha família: minha mãe Lucélia, meu pai Carlos, meu irmão Lin, minha cunhada Adriana e minha afilhada Isabela. Obrigada por me apoiarem, por estarem junto comigo em todos os momentos em que precisei e principalmente, por existirem na minha vida! A vocês, todo o meu amor!

Aos meus amigos do Laboratório de Farmacologia: Ana, Jana, Jóice, Kátia, Larissa, Lets, Paty e Ulisses. Pelo convívio, pelos ensinamentos, pelo apoio, pela descontração, pela

amizade, pela paciência, enfim, por todos os momentos em que estivemos juntos. Vocês são especiais para mim!

Em especial, à Jana, a Lets e à Paty. Obrigada por despendarem o tempo de vocês me ajudando com a parte burocrática de finalização deste trabalho. Obrigada, de coração, pela ajuda! Mais ainda, obrigada pela amizade e também pelos momentos alegres em que nos “fizemos ser vistas”.

À minha “irmã de nariz”, obrigada por no momento de tensão estar ao meu lado. Obrigada por ter tido a paciência de aguentar as minhas flutuações de humor na fase final deste trabalho. Enquanto eu escrevia estes agradecimentos, você estava estudando para ingressar no mestrado; espero de coração, que você tenha alcançado o êxito! E se acaso ainda não tiver dado certo, não se preocupe, pois sua estrela irá brilhar no momento ideal para você. Sou imensamente feliz com sua sincera amizade! “amo-te”.

À minha amiga “diva” Marjory, obrigada pelo curto período que dividimos a bancada. Apesar do pouco tempo, além dos resultados, construímos uma linda amizade! Agradeço por todo o apoio, pelo carinho e em especial, por deixar aqueles dias tensos mais alegres. “amo-te”.

À minha grande e “para sempre” amiga Júlia, que sem me conhecer me acolheu em sua casa na Inglaterra e fez daquela viagem o melhor que eu poderia imaginar, principalmente por nascer ali uma grande e verdadeira amizade. Obrigada por me acompanhar nessa etapa da minha vida, por acreditar em mim e por sempre me apoiar e dar forças quando eu precisei. Obrigada por cada palavra amiga e por existir em minha vida.

À Tayla, uma amiga “rara e eterna”. Obrigada por ter caminhado junto comigo durante a iniciação científica. Mesmo que por pouco tempo, dividimos dúvidas, conflitos pessoais, ideais, sonhos e construímos uma amizade que resiste à distância e ao tempo. Obrigada por me surpreender sempre e conte sempre com minha “espontaneidade natural”.

A todos os meus familiares pelo incentivo. Em especial, à Lucia, o Marco e a Daniela Nishida. Obrigada pelo carinho e apoio dado desde o início da minha caminhada. Tenho certeza que sem a ajuda de vocês minha jornada teria sido ainda mais difícil. A vocês, todo o meu carinho e sinceros agradecimentos por terem contribuído para que eu chegasse até aqui. Vocês são importantes na minha vida.

Aos companheiros do LNED: Adriana, Diego, Kelly, Thalita, Thiago, Thiago (Lord), William. Obrigada pela convivência e pelo apoio direto e indireto na conclusão deste trabalho.

Ao André Mecawi pelas valiosas contribuições para o êxito deste trabalho. Obrigado não só pela parte experimental deste, mas também pelo agradável convívio.

À Maylla, Ivete, Genólia, Priscila, Diego e Dalton. Pessoas únicas que eu conheci em uma etapa importante deste trabalho. Obrigada por me acolherem no momento em que eu estava sozinha na Espanha aprendendo técnicas novas e levando meus resultados para um congresso internacional. Em especial por fazerem dessa minha aventura uma conquista de amizades verdadeiras e que mesmo longe sempre serão sempre lembradas.

Agradeço a banca examinadora pelas sugestões que contribuíram para o enriquecimento deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos a Soninha pelo auxílio com assuntos burocráticos, emocionais e pessoais.

"Ficar parado, esperando um milagre acontecer, não é fé, é preguiça. Fé é acordar todos os dias pela manhã e ir à luta, correr atrás, batalhar, se esforçar. Não se engane, o milagre não virá, é você que tem que ir ao encontro dele."

Autor desconhecido

RESUMO

GONZAGA, NA. **Efeito da abstinência ao etanol sobre o sistema renina-angiotensina-aldosterona e a vasculatura.** 2013. 91 folhas. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

A Abstinência ao Etanol (AE) é uma complicação de curta duração desenvolvida após a interrupção parcial ou total do consumo crônico de etanol. Alguns dos sintomas descritos incluem: aumento transitório da pressão arterial, alteração da resistência vascular periférica e alterações comportamentais; entretanto, os mecanismos envolvidos nessas respostas continuam elusivos. O objetivo desse estudo foi o de investigar os efeitos da abstinência ao etanol sobre o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) e a função vascular. Ratos *Wistar* (250g) foram divididos em 3 grupos: Controle (CTR): os animais receberam água *ad libitum* por 23 dias; Etanol (EtOH): o tratamento crônico com etanol foi iniciado com uma solução de etanol 3% (vol./vol.), sendo gradualmente aumentada a cada três dias para 6% (4º dia) e 9% (7º dia em diante), mantendo-se esta concentração até o 21º dia; Abstinência ao Etanol (AE): os animais foram tratados da mesma maneira que o grupo EtOH até o 20º dia, neste dia a solução de etanol 9% foi retirada e retornada no dia seguinte (21º dia) por apenas 2h; após o término deste período, os animais receberam água até o dia do teste (23º dia), garantindo assim, o quadro de abstinência por 48h. Para avaliar o comportamento, os animais foram testados no Labirinto em Cruz Elevado (LCE). A pressão arterial foi medida por pletismografia de cauda. Foram avaliados os níveis plasmáticos de: a) etanol por cromatografia gasosa; b) corticosterona (CORT), angiotensina I e II (ANGI e II), vasopressina (AVP), ocitocina e peptídeo natriurético atrial (ANP) por radioimunoensaio; c) aldosterona (ALDO), renina (REN) e espécies reativas de oxigênio ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) por ELISA; atividade plasmática da enzima conversora de angiotensina por fluorimetria; d) atividade da NAD(P)H-oxidase em aorta e leito mesentérico pelo método de quimioluminescência da lucigenina; d) de sódio (Na⁺) por fotometria de chama; e) osmolaridade foi medida pelo abaixamento do ponto de congelamento da água. Foi realizada avaliação da reatividade vascular em aorta isolada para angiotensina II (ANG II), fenilefrina, cloreto de potássio, acetilcolina e nitroprussiato de sódio (NPS). A abstinência ao etanol promoveu diminuição significativa da porcentagem de entrada e tempo despendido nos braços abertos do LCE; além disso, houve aumento da concentração plasmática de corticosterona. Em conjunto estes resultados mostram o efeito ansiogênico da abstinência ao etanol. A abstinência ao etanol também promoveu aumento da pressão arterial sistólica e média. Houve aumento do estresse oxidativo sistêmico e tecidual. Em relação ao balanço hidroeletrólítico, não foi encontrada nenhuma alteração induzida pela abstinência ao etanol. A abstinência ao etanol induziu alterações vasculares independentes de endotélio representada por diminuição da contração para ANG II, fenilefrina e KCl e aumento do relaxamento para o nitroprussiato de sódio. A partir destes resultados podemos concluir que a abstinência ao etanol induz ansiedade, estimula o SRAA, induz hipertensão e estresse oxidativo e altera a função vascular de maneira independente de endotélio.

Palavras chaves: abstinência ao etanol, sistema renina-angiotensina-aldosterona, estresse oxidativo.

ABSTRACT

GONZAGA, NA. **Effect of abstinence to ethanol on the renin-angiotensin-aldosterone system and the vasculature.** 2013. 91 folhas Dissertation (Masters) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Ethanol withdrawal is a short-term complication developed after partial or total interruption of chronic ethanol consumption. Some of the symptoms described include: transient increase in blood pressure, peripheral vascular resistance changes and behavioral changes, however, the mechanisms involved in these responses remain elusive. The aim of this study was to investigate the effects of ethanol withdrawal on the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) and vascular function. With this purpose, male Wistar rats (250g) were divided into 3 groups: control (CTR): animals received water *ad libitum* for 23 days, ethanol (EtOH): chronic treatment with ethanol was started with an ethanol solution 3% (vol. / vol.) being gradually increased every three days to 6% (day 4) and 9% (day 7 onwards), being this concentration maintained until day 21; Ethanol abstinence (EA): animals were treated in the same way of the EtOH group until day 20. Then, ethanol solution 9% was removed and returned the next day (day 21) for 2h. After the end of this period, the animals received water until day 23, ensuring abstinence for 48 hours. Animals were tested on the Elevated Plus Maze (EPM). Blood pressure was measured by tail plethysmography. Plasma levels of: a) ethanol were determined by gas chromatography; b) corticosterone (CORT), angiotensin I and II (ANG I and II), vasopressin (AVP), oxytocin, and atrial natriuretic peptide (ANP) by radioimmunoassay; c) aldosterone (ALDO), plasma activity of angiotensin converting enzyme by fluorimetry; renin (REN) and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) by ELISA; d) activity of NAD (P)H in the aorta and mesenteric arterial bed by lucigenin chemiluminescence assay; e) sodium (Na^+) by photometry; f) osmolarity was measured by the lowering of the freezing point of water. Vascular reactivity of isolated aorta to angiotensin II (ANG II), phenylephrine, KCl, acetylcholine, and sodium nitroprusside (SNP) was evaluated. Abstinence to ethanol induced a significant reduction in the percentage of entries and time spent in the open arms of the EPM. Increased corticosterone plasma levels were also detected in animals from the EA group. Together these findings suggest that abstinence to ethanol induces an anxiogenic-like effect. Abstinence to ethanol induced an increase in plasma ANG II with no changes on ANG I, renin or aldosterone levels. The levels of ANG I and ANG II in the aorta and mesenteric arterial bed were not altered in animals from the EA group. Abstinence to ethanol also induced increase in systolic blood pressure and mean arterial blood pressure. Abstinence to ethanol increased systemic oxidative stress and the vascular generation of superoxide anion. No change in the fluid balance was detected in animals from the EA group. In endothelium-denuded, but not intact aortic rings, abstinence to ethanol decreased the contraction induced by ANG II, phenylephrine and KCl. Increased NPS-induced relaxation was also observed in rings from EA animals. We conclude that ethanol withdrawal: a) induces anxiety; b) stimulates the systemic RAAS; c) increases blood pressure; d) induces systemic and vascular oxidative stress; e) alters the vascular function in an endothelium-independent manner.

Keywords: ethanol abstinence, renin-angiotensin-aldosterone system, oxidative stress.

Lista de ilustrações

Figura 1: Esquema de indução de abstinência ao etanol	33
Figura 2: Esquema da cuba de órgão isolado.....	40
Figura 3: Efeito do tratamento crônico com etanol sobre o peso, sobre a ingestão alimentar e líquida.....	43
Figura 4: Efeito da abstinência ao etanol sobre a atividade exploratória do LCE	45
Figura 5: Efeito da abstinência ao etanol sobre a concentração plasmática de corticosterona.....	46
Figura 6: Efeito da abstinência ao etanol sobre a pressão arterial sistólica, diastólica, média e a frequência cardíaca.....	47
Figura 7: Efeito da abstinência ao etanol sobre a concentração plasmática de reína	48
Figura 8: Efeito da abstinência ao etanol sobre as concentrações plasmáticas de ANG I e II.....	49
Figura 9: Efeito da abstinência ao etanol sobre as concentrações de ANG I e II em aorta torácica e leito arterial mesentérico.	50
Figura 10: Efeito da abstinência ao etanol sobre a atividade plasmática da ECA	50
Figura 11: Efeito da abstinência ao etanol sobre a concentração plasmática de aldosterona .	51
Figura 12: Efeito da abstinência ao etanol sobre a osmolaridade plasmática e a concentração plasmática de sódio.....	52
Figura 13: Efeito da abstinência ao etanol sobre a concentração plasmática de TBARS	53
Figura 14: Efeito da abstinência ao etanol sobre a produção de O_2^- derivado da NAD(P)H-oxidase	54
Figura 15: Efeito da abstinência ao etanol sobre a concentração plasmática dos hormônios AVP, ANP e OT	55

Figura 16: Efeito da abstinência ao etanol sobre a contração induzida pela ANG II.....	56
Figura 17: Efeito da abstinência ao etanol sobre a contração induzida pela fenilefrina	57
Figura 18: Efeito da abstinência ao etanol sobre a contração induzida pelo KCl	59
Figura 19: Efeito da abstinência sobre o relaxamento induzido pela acetilcolina e pelo NPS.....	60

Lista de tabelas

Tabela 1: Valores de $E_{máx}$ (gramas de contração) e de pD_2 obtidos em curvas concentração-resposta à angiotensina II em preparações com e sem endotélio.....	56
Tabela 2: Valores de $E_{máx}$ (gramas de contração) e de pD_2 obtidos em curvas concentração-resposta à fenilefrina em preparações com e sem endotélio.	58
Tabela 3: Valores de $E_{máx}$ (gramas de contração) e de pD_2 obtidos em curvas concentração-resposta ao KCl em preparações com e sem endotélio.	59
Tabela 4: Valores de % de relaxamento de relaxamento e de pD_2 obtidos em curvas concentração-resposta à acetilcolina e ao nitroprussiato em preparações com/sem endotélio.	60

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

μL	Microlitro
μmol	Micromol
a.C.	Antes de Cristo
AE	Abstinência ao etanol
ANG I	Angiotensina I
ANG II	Angiotensina II
ANP	Peptídeo natriurético atrial
AVP	Vasopressina
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CID	Classificação Internacional de Doenças
Cm	Centímetro
CO ₂	Gás carbônico
Cpm	Cintilância por minuto
CTR	Controle
DSM	<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders</i>
ECA	Enzima conversora de angiotensina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetraacético
E _{max}	Efeito máximo
eNOS	Enzima óxido nítrico sintase endotelial
ERO	Espécie reativa de oxigênio
EtOH	Etanol
FA	Frequência de entrada no braço aberto
FF	Frequência de entrada no braço fechado
f _{mol}	Fentomol
G	Gramas (gramas)
H	Hora (horas)

HCl	Cloreto de hidrogênio
HPA	<i>Hypothalamic-pituitary-adrenal axis</i>
iNOS	Enzima óxido nítrico sintase induzível
KCl	Cloreto de potássio
Kg	Quilograma
KH ₂ PO ₄	Hidrogenofosfato de Potássio
L	Litro (litros)
LCE	Labirinto em cruz elevado
MDA	Malondialdeído
mEq	Milique
MgSO ₄	Sulfato de magnésio
Min	Minuto (minutos)
mL	Mililitro (mililitros)
mM	Milimolar
Mm	Milimetro (milímetros)
NaCl	Cloreto de sódio
NAD(P)H	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
Nmol	Nanomol
nNOS	Enzima óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
O ₂	Oxigênio
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
°C	Graus Celsius
OMS	Organização mundial da saúde
ONOO ⁻	Peroxinitrito
OT	Ocitocina
pD ₂	logaritmo negativo da concentração molar
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
PRL	Prolactina
RIE	Radioimunoensaio

Rpm	Rotações por minuto
SAA	Síndrome de abstinência ao etanol
SENAD	Secretária Nacional Antidrogas
SRAA	Sistema renina-angiotensina
TA	Tempo despendido no braço aberto
TBARS	Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
TF	Tempo despendido no braço fechado
TFA	ácido trifluoroacético
USP	Universidade de São Paulo
Vol	Volume
Mg	Miligrama (miligramas)
dL	Decilitro (decilitros)
E.P.M.	Erro padrão da média
N	Número de animais por grupo
Pg	Picograma (picogramas)
H ₂ O	Água
μL	Microlitro
μmol	Micromol
a.C.	Antes de Cristo
AE	Abstinência ao etanol
ANG I	Angiotensina I
ANG II	Angiotensina II
ANP	Peptídeo natriurético atrial
AVP	Vasopressina
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CID	Classificação Internacional de Doenças
Cm	Centímetro
CO ₂	Gás carbônico
Cpm	Cintilância por minuto

Sumário

Introdução.....	21
Objetivo geral.....	30
Objetivo específico.....	30
Materiais e Métodos.....	30
1. Animais.....	32
2. Grupos experimentais.....	32
3. Determinação dos níveis plasmáticos de etanol	33
4. Teste no Labirinto em Cruz Elevado.....	34
5. Determinação dos níveis de hormônios.....	35
5.1. Extração de hormônios.....	36
5.2. Determinação dos níveis hormonais	36
6. Determinação dos níveis plasmáticos de aldosterona	37
7. Determinação dos níveis plasmáticos de renina	37
8. Determinação da atividade plasmática da ECA.....	37
9. Evolução temporal da pressão arterial sistólica, diastólica, média e frequência cardíaca.....	37
10. Determinação dos níveis plasmáticos de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	38
11. Determinação do ânion superóxido (O ₂ ⁻) pelo método de quimioluminescência da lucigenina.....	38
12. Determinação da osmolaridade plasmática.....	39
13. Determinação dos níveis plasmáticos de sódio.....	39
14. Estudo funcional da reatividade vascular	39
15. Análise estatística	41
Resultados	43
1. Evolução temporal do peso, da ingestão alimentar e líquida dos animais	43
2. Dosagem dos níveis plasmáticos de etanol.....	44
3. Efeito da abstinência ao etanol sobre o comportamento de animais testados no LCE.....	44

4. Efeito da abstinência ao etanol sobre as concentrações plasmáticas de corticosterona.....	45
5. Efeito da abstinência ao etanol sobre a pressão arterial sistólica, diastólica e frequência cardíaca.....	46
6. Efeito da abstinência ao etanol sobre as concentrações plasmáticas de renina.....	47
7. Efeito da abstinência ao etanol sobre as concentrações plasmáticas de ANG I e II.....	48
8. Efeito da abstinência ao etanol sobre as concentrações teciduais de ANG I e II em aorta torácica e leito arterial mesentérico.....	49
9. Efeito da abstinência ao etanol sobre a concentração plasmática de aldosterona.....	51
10. Efeito da abstinência ao etanol sobre a osmolaridade plasmática e a concentração de sódio.....	51
11. Efeito da abstinência ao etanol sobre a concentração plasmática de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	52
12. Efeito da abstinência ao etanol sobre a produção de ânion superóxido (O_2^-) em aorta e leito mesentérico.....	53
13. Efeito da abstinência ao etanol sobre a concentração plasmática dos hormônios AVP, ANP e OT.....	54
14. Reatividade vascular.....	55
14.1. Efeito da abstinência ao etanol sobre a reatividade vascular em anéis com ou sem endotélio à ANG II.....	55
14.2. Efeito da abstinência ao etanol sobre a reatividade vascular em anéis com ou sem endotélio à fenilefrina	57
14.3. Efeito da abstinência ao etanol sobre a reatividade vascular em anéis com ou sem endotélio ao KCl	58
14.4. Efeito da abstinência ao etanol sobre a reatividade vascular à acetilcolina e ao nitroprussiato de sódio	59
Discussão	62
Conclusão	73
Revisão bibliográfica.....	75

Anexo..... 90

O consumo de substâncias psicoativas é hoje um dos fenômenos mais frequentes na população mundial (ELLIOTT e BOWER, 2008). O etanol está entre estas substâncias, sendo a mais consumida em todo o mundo. A bebida alcoólica é composta pelo álcool etílico ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) e o seu primeiro indicativo de uso pelo ser humano data aproximadamente de 6.000 a.C. (MASUR, 1998), ou seja, é um costume antigo, presente em diversas culturas e que ainda está presente nos hábitos atuais da população (GIGLIOTTI e BESSA, 2004).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2004), aproximadamente 2 bilhões de pessoas em todo o mundo consomem etanol e a população brasileira é a quarta maior consumidora de etanol das Américas (OMS, 2011). Em 2007 foi avaliado pela Secretaria Nacional Antidrogas (SENAD) os padrões de consumo de álcool na população brasileira; o estudo foi realizado em 143 municípios do país e detectou que 52% dos brasileiros acima de 18 anos fez uso de bebida alcoólica pelo menos uma vez ao ano; do total de homens adultos, 11% bebem todos os dias e 28% de 1 a 4 vezes por semana. Em relação à intensidade do consumo de bebidas alcoólicas, 24% da população bebe frequentemente e pesado (pelo menos uma vez por semana, 5 ou mais doses) e 29% são bebedores pouco frequentes e não fazem uso pesado (SENAD, 2007).

O consumo crônico ou excessivo de etanol, caracterizado por um consumo diário acima de 30g de etanol, pode afetar diferentes sistemas do organismo e o uso contínuo e de forma excessiva dessa substância pode levar ao quadro conhecido como alcoolismo (CARVALHO, PINSKY, *et al.*, 1995; SANCHIS e ARAGÓN, 2007; SCHUCKIT, 2009). Segundo Edwards e Guthrie (1976), o alcoolismo é definido como uma síndrome multifatorial, com comprometimento físico, mental e social. O consumo crônico de etanol acarreta alterações significativas da função circulatória, figurando como um importante fator de risco no desenvolvimento de doenças cardiovasculares, como por exemplo, a hipertensão arterial (MATHEWS, 1976; MacMAHON, 1987; FUCHS, CHAMBLESS, *et al.*, 2001; YOSHITA, MIURA, *et al.*, 2005; SKLIROS, PAPADODIMA, *et al.*, 2012). Em 1915, Lian demonstrou que há uma relação positiva entre o consumo de etanol e o aumento da pressão arterial. Desde então, vários estudos na América do Norte, Austrália, Japão e Europa (MacMAHON, 1987; YOSHITA, MIURA, *et al.*, 2005; SESSO, COOK, *et al.*, 2008; SKLIROS, PAPADODIMA, *et al.*, 2012) mostraram aumento da prevalência de hipertensão arterial em indivíduos que consomem etanol regularmente. No Brasil, as doenças cardiovasculares são as principais causas de morte, sendo responsáveis por 20 a 30% do total

de óbitos (HERNADEZ-HERNADEZ, ARMAS-PADILHA, *et al.*, 1998, VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial, 2010) e o consumo de etanol figura como um importante fator de risco para o desenvolvimento dessas doenças em nosso país (FUCHS, CHAMBLESS, *et al.*, 2001).

O efeito do etanol sobre a pressão arterial está associado à quantidade ingerida desse composto. Em seres humanos, o consumo moderado (entre três e cinco doses diárias¹) ou abusivo de etanol (superior a seis doses diárias) induz aumento da pressão sistólica (>150-160 mmHg) e diastólica (>95 mmHg) (KLATSKY, FRIEDMAN, *et al.*, 1977; MacMAHON, BLACKET, *et al.*, 1984). A partir disso, vários estudos foram desenvolvidos na tentativa de compreender os mecanismos envolvidos na disfunção cardiovascular induzida pelo consumo crônico de etanol. Como consequência, algumas teorias foram discutidas para explicar esse processo, entre os mecanismos propostos destacam-se: 1) alteração da reatividade vascular; 2) disfunção endotelial; 3) alterações nos sistemas que controlam a liberação de substâncias endógenas envolvidas na manutenção das funções vasculares.

Em relação ao mecanismo miogênico, tem sido sugerido que o aumento da reatividade vascular a agentes vasoconstritores (PINARDI, BRIEVA, *et al.*, 1992; STRICKLAND e WOOLLES, 1988; TIRAPELLI, AL-KHOURY, *et al.*, 2006a; TIRAPELLI, LEONE, *et al.*, 2008) e/ou diminuição do efeito de agentes vasorelaxantes (KAHONEN, KARJALA, *et al.*, 1999; TIRAPELLI, LEONE, *et al.*, 2008) contribuem para o aumento da pressão arterial associado ao consumo crônico de etanol. Estudos experimentais sugerem que a disfunção vascular decorrente do consumo de etanol é consequência da disfunção endotelial. Nesse sentido, Sun e Mayan (2001) mostraram que o consumo crônico de etanol induz estresse oxidativo e reduz o relaxamento de artérias cerebrais mediado pelo óxido nítrico (NO), sendo esse efeito revertido por antioxidantes. Da mesma forma, Husain *et al.* (2005) sugeriram que o consumo crônico de etanol induz hipertensão por um mecanismo que envolve disfunção endotelial causada pelas espécies reativas de oxigênio (ERO) com consequente redução da biodisponibilidade de NO. Mais recentemente, esses pesquisadores demonstraram que o consumo de etanol induz aumento da atividade da enzima NAD(P)H-oxidase, aumento da resposta contrátil à fenilefrina e redução da resposta de relaxamento à acetilcolina em aorta de

¹ uma dose equivale a 8-10 gramas de etanol (MacMAHON, 1987), que no contexto Brasileiro corresponde a 350 mL de cerveja ou 90 mL de vinho (SENAD, 2005).

ratos (HUSAIN *et al.*, 2007). Além disso, o etanol pode induzir alterações na produção e/ou na liberação de substâncias endógenas que controlam a função vascular e que podem estar associadas às alterações cardiovasculares induzidas pelo consumo de etanol. Segundo Bannan *et al.* (1984) e Ibsen (1985) o consumo de etanol aumenta a concentração plasmática da enzima renina, responsável pela transformação do angiotensinogênio em angiotensina I (ANG I). Simultâneo ao aumento de renina foi também identificado que o consumo de etanol aumenta os níveis plasmáticos de aldosterona e cortisol (POTTER, BANNAN, *et al.*, 1983; MANDER, JOVENS, *et al.*, 1989). Em conjunto, esses resultados mostram que o consumo crônico de etanol induz ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA).

Por outro lado, quando há a interrupção total ou parcial do consumo de etanol por indivíduos alcoolistas pode ocorrer sintomas de intensidade variada caracterizados, segundo a Classificação Internacional de Doenças (CID-10 – 10ª edição; OMS) e o *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (DSM-IV – 4ª edição; Associação Psiquiátrica Americana), como a Síndrome de Abstinência Alcoólica (SAA). Os sinais e sintomas da SAA podem variar quanto à intensidade e gravidade e podem aparecer após a redução parcial ou total do consumo de etanol (LARANJEIRA, HASDAHD, *et al.*, 2000; CARLSON, KUMAR, *et al.*, 2012). Cerca de 70% dos indivíduos em tratamento para desintoxicação apresentam sintomas de abstinência ao etanol (MYRICK e ANTON, 1998); os sintomas, que em casos graves podem levar à morte, incluem sudorese, tremores, ansiedade, agitação, convulsões, alucinações, desorientação *delirium tremens* e hipertensão arterial (LARANJEIRA, HASDAHD, *et al.*, 2000; MACIEL e FLORENCE, 2004). Apesar do conhecimento de que o consumo crônico de etanol acarreta alteração da função vascular, induzindo hipertensão arterial, poucos estudos avaliaram os mecanismos envolvidos nas alterações cardiovasculares observadas durante a abstinência ao etanol.

Alguns estudos delineados de forma a investigar o efeito da abstinência ao etanol sobre o sistema cardiovascular verificaram aumento da pressão arterial e alterações do tônus vascular. Clark e Friedman (1985) observaram que a abstinência ao etanol induziu aumento da pressão arterial e dos níveis plasmáticos de adrenalina em humanos. Neste trabalho, os autores observaram também que o aumento transitório da pressão arterial induzido pela abstinência ao etanol foi acompanhado por hiper-responsividade vascular. Aumento transitório da pressão arterial também foi observado por King *et al.* (1994), em indivíduos em abstinência ao etanol por 72 horas. Os autores constataram ainda, que o aumento da pressão

arterial induzido pela abstinência ao etanol promoveu disfunção cardiovascular persistente e que foi observada na quarta semana de abstinência. Resultados semelhantes foram observados em mulheres onde a abstinência ao etanol induziu aumento transitório da pressão arterial e da resistência vascular periférica (BERNARDY, KING e LOVALLO, 2003). Ceccanti *et al.*, 2006 mostraram que em estágios iniciais da abstinência ao etanol há aumento transitório da pressão arterial. Apesar do fato de que a abstinência ao etanol induz aumento da pressão arterial, pouco se sabe a respeito dos mecanismos mediadores dessa resposta. Como mencionado anteriormente, a alteração da reatividade vascular, a disfunção endotelial e a liberação de mediadores endógenos que controlam a função vascular são sugeridos como mecanismos envolvidos na disfunção cardiovascular induzida pelo consumo crônico de etanol e poderiam também ser responsáveis pelas alterações da pressão arterial induzida pela abstinência ao etanol. Entretanto, a literatura acerca dos efeitos da abstinência ao etanol sobre a função cardiovascular é escassa e informações detalhadas sobre os mecanismos envolvidos nessa resposta continuam elusivas.

A abstinência ao etanol induz aumento do estresse oxidativo. O termo estresse oxidativo, originalmente conceituado como o dano molecular causado por uma desigualdade entre agentes pró-oxidantes e antioxidantes, principalmente pelo aumento de ERO (CADENAS e SIES, 1985). Atualmente há uma definição mais elaborada e relacionada especificamente ao comprometimento da sinalização e equilíbrio das reações de oxidação e redução, uma vez que se sabe que as ERO modulam vias de sinalização celulares específicas (“sinalização redox”) (MONTEZANO e TOUYZ, 2012). Dentre as principais ERO produzidas em células endoteliais e do músculo liso vascular, o ânion superóxido (O_2^-) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) são particularmente importantes, pois ativam diferentes vias intracelulares de sinalização (PARAVICINI e TOUYZ, 2008). As ERO são relevantes na fisiopatologia de diferentes doenças cardiovasculares e poderiam desempenhar importante função nas alterações cardiovasculares induzidas pela abstinência ao etanol. De fato, Yuksel *et al.* (2005), mostraram que, em humanos, a abstinência ao etanol induz aumento dos níveis plasmáticos de malondialdeído (MDA), que é utilizado como um índice para avaliação do estresse oxidativo sistêmico. Em ratos, a abstinência ao etanol por 24 e 48 horas induziu lipoperoxidação em estruturas do SNC como o hipocampo e cerebelo (JUNG, REWAL, *et al.*, 2004). Resultados semelhantes foram observados por Rewal *et al.* (2004), em ratos em abstinência ao etanol por 7 horas. A lipoperoxidação induzida pela abstinência ao etanol no

SNC foi associada à geração de ERO, uma vez que a abstinência ao etanol por 24 horas induziu aumento dos níveis teciduais (hipocampo, cerebelo e córtex) de O_2^- (JUNG, SIMPKINS, *et al.*, 2008). Apesar da abstinência ao etanol aumentar o estresse oxidativo sistêmico e tecidual, não há estudos descrevendo a participação das ERO nas alterações vasculares associadas à abstinência ao etanol.

Além de suas ações diretas sobre os tecidos, as ERO, como por exemplo, o O_2^- , podem interagir com o NO para formar o peroxinitrito ($ONOO^-$) (BECKMAN e KOPPENOL, 1996). Essa interação tem algumas consequências importantes para a função vascular, pois o $ONOO^-$ tem ações pró-oxidantes e sua formação acarreta redução da biodisponibilidade do NO (BECKMAN e KOPPENOL, 1996). No vaso, o NO desempenha importante função como modulador do tônus vascular, sendo descrito como o principal fator de relaxamento derivado do endotélio (FURCHGOTT, 1999). Três isoformas da enzima NO sintase (NOS) são responsáveis pela formação de NO: a iNOS (ou NOS-2) que é uma isoforma induzível da enzima e duas isoformas constitutivas, a NOS endotelial (eNOS ou NOS-3) e a NOS neuronal (nNOS ou NOS-1). Alguns estudos mostram que o consumo crônico de etanol induz redução dos níveis de NO e da expressão da eNOS em tecido vascular, sendo que essa resposta induz disfunção endotelial e é responsável pela alteração da reatividade vascular e aumento da pressão arterial (HUSAIN, VASQUEZ-ORTIZ e LALLA, 2007; TIRAPELLI, LEONE, *et al.*, 2008). No entanto, o efeito da abstinência ao etanol sobre o sistema nitrérgico vascular continua elusivo.

Em modelos animais, os sinais e sintomas de abstinência ao etanol têm sido bem caracterizados e estas respostas são bem semelhantes às observadas em humanos (BUCK, HUESTON, *et al.*, 2011). Animais submetidos à retirada do etanol podem apresentar rigidez da cauda, espasmos musculares, rigidez corporal (FRIEDMAN, 1980), exacerbação de crises (BECKER, 2000), aversão a espaços abertos (KOOB e BRITTON, 1996; PADOVAN, 2010), diminuição da atividade social (VARLINSKAYA e SPEAR, 2004), além da diminuição de uma série de outras alterações comportamentais. Alguns dos sintomas da abstinência ao etanol podem aparecer após 6 horas de interrupção total ou diminuição do consumo de etanol (TREVISAN, BOUTROS, *et al.*, 1998) e geralmente estão associados com humor depressivo (DE WITTE, PINTO, *et al.*, 2003; BAYARD, McINTYRE, *et al.*, 2004), e ansiedade, que

está entre as comorbidades mais comuns associadas aos dependentes de etanol (MONTEIRO, 2004; ALVES, KESSLER e RATTO, 2004).

Em animais, o grau de ansiedade pode ser avaliado por meio do Labirinto em Cruz Elevado (LCE), que é considerado um modelo de aproximação experimental para o estudo da ansiedade generalizada em animais abstêmios (FILE, 1994; CABRAL, ISOARDI, *et al.*, 2006; ZHAO, WEISS e ZORRILLA, 2007; ECONOMIDOU, CIPPITELLI, *et al.*, 2011). O fundamento do LCE está relacionado com o medo incondicionado e com o comportamento exploratório espontâneo do animal, representado na aversão específica que os roedores apresentam para lugares abertos. Recentemente, estudos de nosso grupo de pesquisa mostraram que em animais tratados cronicamente com etanol (6% vol./vol.), a abstinência ao etanol por um período de 48 horas induziu redução da exploração dos braços abertos do LCE, caracterizando o efeito ansiogênico induzido pela abstinência ao etanol (PADOVAN, BATISTELA, *et al.*, 2010).

Além disso, segundo a literatura, os quadros de ansiedade e estresse associados à abstinência ao etanol induzem ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (*hypothalamic-pituitary-adrenal axis*, HPA), com consequente aumento dos níveis plasmáticos de cortisol (RISHER-FLOWERS, ADINOFF, *et al.*, 1988; ADINOFF, RISHER-FLOWERS, *et al.*, 1991; ADINOFF, IRANMANESH, *et al.*, 1998) e corticosterona (DALLMAN e JONES, 1973; DALLMAN, AKANA, *et al.*, 1992; AKANA e DALLMAN, 1997; VAN DE KAR e BLAIR, 1999). Além da ativação do eixo HPA, sabe-se que a abstinência ao etanol também está relacionada com a ativação do SRAA. Potter *et al.* (1984), mostraram que, em humanos, a abstinência ao etanol por 4 dias induziu aumento dos níveis plasmáticos de renina, aldosterona e cortisol. Clark e Friedman (1985) identificaram aumento da atividade de renina plasmática em indivíduos abstêmios por 72 horas. Bezzegh *et al.* (1991) observaram aumentos dos níveis plasmáticos de aldosterona e renina em indivíduos em abstinência ao etanol por 24 horas sendo que esses valores estavam normalizados após 10 dias de abstinência. Em conjunto, esses estudos evidenciam uma relação entre a abstinência ao etanol e a ativação do SRAA. No entanto, é importante ressaltar que os estudos descritos avaliaram parcialmente a ativação do SRAA, onde foram investigados principalmente dois componentes desse sistema, a renina e a aldosterona. Portanto, não há relatos detalhados sobre o efeito da abstinência ao etanol sobre o SRAA sistêmico ou mesmo sobre o SRAA tecidual. Tal

avaliação torna-se pertinente, pois o SRAA regula diversas funções fisiológicas figurando como um dos principais sistemas reguladores da pressão arterial.

O SRAA é um complexo sistema hormonal, cujo papel fundamental está relacionado com a homeostasia hidroeletrolítica do organismo e com o controle da pressão arterial (MENARD, 1993), estimulando também a liberação de aldosterona pelo córtex da supra renal. No entendimento clássico do SRAA, a substância ativa, a angiotensina II (ANG II), que é a responsável pela maioria dos efeitos fisiológicos observados, exerce suas ações em órgãos-alvo distantes do local de produção (DZAU e PRATT, 1986). Esse peptídeo é produzido sistemicamente pelo SRAA clássico onde a enzima renina circulante, produzida pelas células justaglomerulares nas arteríolas aferentes dos glomérulos renais, cliva o angiotensinogênio, uma proteína produzida pelo fígado. A liberação de renina é estimulada principalmente pela redução da pressão de perfusão renal, redução dos níveis de sódio na mácula densa localizada no túbulo distal, e pelo aumento da atividade simpática (KHAYAT, GONDA, *et al.*, 1981; TORRETTI, 1982). A ação da renina sobre o angiotensinogênio gera o decapeptídeo ANG I que é convertido em ANG II pela ação da enzima conversora de angiotensina (ECA) (PHILLIPS, SPEAKMAN e KIMURA, 1993). As ações fisiológicas da ANG II são mediadas pelos receptores AT₁ e AT₂, dois receptores acoplados à proteína G (DE GASPARO, CATT, *et al.*, 2000). As principais ações fisiológicas da ANG II são mediadas pelos receptores AT₁ e incluem contração vascular, secreção de aldosterona, reabsorção de sódio tubular e ativação do sistema autônomo simpático (NGUYEN, DINH CAT e TOUYZ, 2011). Na vasculatura, os receptores AT₁ são expressos nas células do músculo liso vascular e no endotélio, onde são responsáveis pelos processos de contração e produção de NO, respectivamente (TOUYZ e SCHIFFRIN, 2000). As ações fisiológicas do receptor AT₂ não são totalmente esclarecidas, mas sabe-se que ele é expresso nos vasos, células justaglomerulares, glomérulo e seus efeitos parecem contrapor os do receptor AT₁ (HORIUCHI, AKISHITA e DZAU, 1999). Nos vasos, os receptores AT₂ estão relacionados à vasodilatação via NO, prostanóides vasodilatadores, abertura de canais para K⁺ e liberação de cininas (ISRAAEL, CIERCO e SOSA, 2000; DIMITROPOULOU, 2001).

Os componentes do SRAA também foram descritos nos vasos, indicando que o tecido vascular é capaz de produzir ANG II localmente (SWALES e SAMANI, 1993). A expressão de angiotensinogênio, ECA, ANG I e ANG II foi demonstrada em veias e artérias (OLIVER e SCIACCA, 1984; PAUL, WAGNER e DZAU, 1993; SWALES e SAMANI, 1993). Apesar

de bem estabelecido o fato de que os vasos sintetizam ANG II, ainda há controvérsia se a renina é sintetizada localmente ou se é captada para o interior do vaso para promover a síntese de ANG II tecidual. O SRAA tecidual age de maneira autócrina, parácrina e endócrina. O aumento dos níveis dos componentes do SRAA tecidual ocorre em condições de patologia cardiovascular como aterosclerose, infarto do miocárdio, falência cardíaca, diabetes e doença renal (RAIZADA, SKIPPER, *et al.*, 2007).

Além dos efeitos fisiológicos de controle da função cardiovascular, a ANG II também está envolvida na fisiopatologia de doenças cardiovasculares, uma vez que esse peptídeo induz a formação de ERO no endotélio e no músculo liso vascular (TOUYZ e SCHIFFRIN, 2000). Esse processo ocorre via receptores AT₁ e consequente ativação da enzima NAD(P)H-oxidase (ZAFARI, USHIO-FUKAI, *et al.*, 1998). Nesse sentido, Polikandriotis *et al.* (2006), descreveram ativação da NAD(P)H-oxidase e aumento dos níveis de O₂⁻ no pulmão de ratos tratados com etanol, sendo essa resposta bloqueada pelo lisinopril, um inibidor da ECA. Husain *et al.* (2008) detectaram níveis elevados de ANG II no plasma e aorta de animais tratados cronicamente com etanol. Juntos esses estudos mostram que o consumo crônico de etanol induz a ativação do SRAA sistêmico e tecidual, sendo este último um importante mediador da disfunção vascular associada ao etanol. No entanto, as consequências da abstinência sobre o SRAA continuam elusivas.

Portanto, com base nos dados da literatura, a hipótese do presente estudo é a de que a abstinência ao etanol induza ansiedade e ativação do SRAA com consequente aumento das ERO. Em conjunto, estas respostas levariam à alterações da reatividade vascular e ao aumento da pressão arterial associado à abstinência ao etanol. Apesar da existência de estudos mostrando que o consumo crônico de etanol induz ativação do SRAA, aumento do estresse oxidativo e da pressão arterial, não há estudos mostrando o efeito da abstinência ao etanol sobre o SRAA e a vasculatura. Portanto, o presente estudo foi delineado de forma a investigar os efeitos da abstinência ao etanol sobre a função vascular e o SRAA sistêmico e tecidual.

Objetivo geral

Avaliar as consequências da abstinência ao etanol sobre: o sistema renina-angiotensina-aldosterona, a pressão arterial e sobre a vasculatura.

Objetivos específicos

- Avaliar as concentrações plasmáticas de etanol.
- Avaliar se a abstinência ao etanol induz alteração na atividade exploratória do LCE.
- Avaliar se a abstinência ao etanol induz alteração nos níveis plasmáticos dos hormônios: vasopressina, ocitocina, angiotensina I e II, corticosterona e peptídeo natriurético atrial.
- Avaliar se a abstinência ao etanol induz alterações nas concentrações plasmáticas de renina.
- Avaliar se a abstinência ao etanol induz hipertensão arterial e alteração na frequência cardíaca.
- Avaliar se a abstinência ao etanol induz estresse oxidativo sistêmico.
- Avaliar se a abstinência ao etanol induz formação de O_2^- tecidual.
- Avaliar se a abstinência ao etanol induz alteração na osmolaridade.
- Avaliar se a abstinência ao etanol induz alteração nos níveis plasmáticos de sódio.
- Avaliar se a abstinência ao etanol induz alteração na reatividade vascular.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Animais

Foram utilizados ratos *Wistar* de 8 a 10 semanas de idade e com peso médio entre 230-250 gramas, provenientes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP). Os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - protocolo 11.1.1212.53.55) do Campus de Ribeirão Preto da USP. Os animais tiveram livre acesso à dieta líquida e sólida e, foram mantidos em sala com temperatura e constantes (23 °C) e com ciclos claro/escuro (12/12 horas).

2. Grupos experimentais

Os animais foram divididos em três grupos: *Controle* (CTR), *Etanol* (EtOH) e *Abstinência ao Etanol* (AE). Os animais do grupo controle receberam água *ad libitum* por 23 dias. Para os animais do grupo etanol, o tratamento crônico com etanol foi iniciado com uma solução de etanol 3% (vol./vol.), gradualmente aumentado, a cada três dias, para 6% (4° dia) e 9% (7° dia em diante), mantendo-se esta concentração até o 21° dia. Os animais do grupo abstinência ao etanol foram tratados da mesma maneira que os animais do grupo etanol até o 20° dia. No 20° dia, a solução de etanol 9% foi retirada (privação de 12h)² e retornada no dia seguinte (21° dia) por apenas 2 horas, sendo que após o término desse período, os animais receberam apenas água até o dia do teste (23° dia). Com isso, foi garantida a instalação de um quadro de abstinência ao etanol de 48 horas (Figura 1) (Adaptado de PADOVAN, 2010).

² A privação de bebida (água ou etanol) por vinte e quatro horas leva o animal a consumir o líquido apresentado após esse período, garantindo, dessa forma, o período de abstinência posterior de 48 horas.

Figura 1: Esquema de indução de abstinência ao etanol. Os animais dos grupos *etanol* e *abstinência ao etanol* foram tratados por 21 dias com soluções crescentes de etanol (3 a 9% vol./vol.); sendo que apenas os animais do grupo *abstinência* permaneceram em abstinência por 48 horas. Os animais do grupo *controle* receberam água *ad libitum* por 23 dias.

3. Determinação dos níveis plasmáticos de etanol

Os animais foram anestesiados com uretana 1,25g/Kg em solução de 25% e o sangue (1 mL) foi coletado da veia cava inferior usando seringas heparinizadas. A fim de conservar as amostras, as mesmas foram acondicionadas em tubos plásticos contendo o fluoreto de sódio (1 mg/mL de sangue). Os frascos foram então devidamente lacrados e colocados no Head Space HSS4A (Shimadzu, Japão). Em seguida, as amostras foram injetadas no cromatógrafo GC17A (Shimadzu, Japão). Uma curva padrão de calibração foi previamente realizada onde diferentes concentrações conhecidas de etanol (0,02–2,0 mg/mL) foram adicionadas ao sangue de animais controle. Os resultados foram expressos em mg de etanol / dL de sangue.

Objetivo: Avaliar as concentrações plasmáticas de etanol.

4. Teste no Labirinto em Cruz Elevado

O labirinto em cruz elevado (LCE) é um aparato de madeira, constituído por dois braços fechados e dois braços abertos de mesmas dimensões (50×10 cm), que se cruzam perpendicularmente acima do nível do solo (50 cm), havendo uma plataforma central (10×10 cm). Os braços abertos são cercados por uma barreira de *plexiglass* (1 cm de altura) para evitar uma possível queda do animal (PELLOW, CHOPIN, *et al.*, 1985), enquanto os braços fechados são circundados por paredes de 40 cm de altura. O teste no LCE foi realizado por 5 minutos. Os animais dos três grupos experimentais foram colocados no centro do labirinto com a cabeça voltada para os braços fechados. O comportamento exploratório de cada animal foi gravado por sistema de vídeo acoplado a um computador. Terminado o teste, o animal foi levado de volta a sua gaiola e o equipamento limpo com um papel higiênico embebido em solução de etanol 15%.

Primeiramente foram calculados os valores das porcentagens de frequência e de tempo despendidos nos braços abertos em relação aos valores totais (braços abertos + fechados) de frequência e tempo despendido, como apresentado na fórmula abaixo:

$$\%FA = 100 * [FA/(FA+FF)]$$

e

$$\%TA = 100 * [TA/(TA+TF)];$$

onde:

FA = frequência (ou número) de entradas nos braços abertos;

FF = frequência (ou número) de entradas nos braços fechados;

TA = tempo despendido nos braços abertos;

FF = tempo despendido nos braços fechados.

Após calcular as porcentagens de frequência e tempo despendidos, e o número de entradas nos braços fechados, os dados foram submetidos a uma análise de variância de uma via (Oneway ANOVA), seguida do teste Duncan. Valores de $p < 0,05$ foram considerados como significativos.

Objetivo: Avaliar se a abstinência ao etanol induz alteração na atividade exploratória do LCE.

5. Determinação dos níveis de hormônios

As amostras de sangue foram coletadas por decapitação no período da manhã a fim de evitar alterações hormonais ao longo do dia. O sangue foi armazenado em tubos contendo heparina (10 µL/mL) para as dosagens de corticosterona, vasopressina (AVP), ocitocina (OT) e ou em tubos contendo inibidores de peptidases (benzoato *p*-hidroximercurio: 1 mol/L, 10-fenantrolina: 30 mol/L, fluoreto de fenilmetilsulfonil - PMSF: 1 mol/L, pepstatina A: 1 mol/L, ácido etilenodiamino tetracético - EDTA 10%) para as dosagens de ANP, ANG I e II. O plasma foi obtido após centrifugação (3000 rpm, 20 min, 4 °C) e estocado a -20 °C, até o dia da realização das dosagens hormonais. Os tecidos aorta e leito mesentérico foram retirados após a decapitação e congelados em nitrogênio líquido e posteriormente armazenados a -80 °C até o dia da realização das dosagens hormonais.

Todas as dosagens hormonais foram realizadas por radioimunoensaio (RIE) específico para cada hormônio. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Neuroendocrinologia do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP. A análise das amostras foi determinada em duplicata em um mesmo experimento.

5.1. Extração dos hormônios

A AVP e a OT foram extraídos do plasma com acetona e éter de petróleo. Para a extração, 1 mL de plasma foi transferido para um tubo contendo 2 mL de acetona gelada (MercK, Brasil), seguido por agitação de 30 segundos e centrifugação (2500 rpm, 25 min, 4 °C); a seguir, o sobrenadante foi decantado para um tubo contendo 2 mL de éter de petróleo (Reagen, Brasil), sendo submetido a agitação e reservado durante 2 min; o sobrenadante (éter de petróleo) foi desprezado por aspiração e o líquido restante (acetona) contendo o AVP e OT foi submetido ao processo de liofilização. No momento do ensaio, o produto liofilizado foi ressuscitado com 250 µL de tampão do ensaio.

A extração de corticosterona foi realizada a partir da adição de 1 mL de etanol (4 °C) a 25 µL de plasma, sendo logo em seguida submetido à centrifugação (2500 rpm, 15 min, 4 °C). Em seguida, o sobrenadante foi transferido para outro tubo e liofilizado. No momento do ensaio, o produto liofilizado foi ressuscitado com 1,5 mL de tampão do ensaio.

Os hormônios ANG I e II foram extraídos de amostras plasmáticas e teciduais de aorta e leito mesentérico. As amostras teciduais foram homogeneizadas com 0,045 N de HCl em etanol (10 ml/g de tecido) contendo 0,9 $\mu\text{mol/L}$ de benzoato de p-hidroximercurio, 131,5 $\mu\text{mol/L}$ de 1,10-fenantrolina, 0,9 $\mu\text{mol/L}$ de fluoreto de fenilmetilsulfonil, 1,75 $\mu\text{mol/L}$ de pepstatina A, 0,032% EDTA e 0,0043% albumina bovina livre de protease. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford. Em seguida o homogeneizado foi centrifugado (10.000 rpm, 40 min, 4 °C) e o sobrenadante liofilizado, sendo em seguida ressuspenso em 2 mL de ácido trifluoroacético 0,1% (TFA; Sigma-Aldrich, EUA). A partir desse ponto, as amostras de plasma e de tecido (acidificado com 2 mL de TFA) foram submetidos à extração de ANP, ANG I e II em colunas Bond-Elut (Peninsula Laboratories, EUA). Para tanto, as colunas foram pré-ativas com 4 mL de uma solução de acetonitrila a 60% (Merck, EUA) diluída em TFA 0,1% seguido de 20 mL de TFA 0,1%. Em seguida as amostras foram aplicadas individualmente nas colunas e lavadas com mais 20 mL de TFA 0,1%.

Todos os procedimentos de extração foram realizados sobre gelo. Para determinar a eficiência da extração dos hormônios pelos métodos utilizados, uma quantidade de (~25.000 cpm) do peptídeo marcado com ^{125}I foi adicionada a 1 mL de plasma, o qual foi submetido às extrações, como descrito acima. Os sobrenadantes e os precipitados, gerados em cada uma das etapas da extração, foram analisados no contador gama e, a partir dos valores de suas radioatividades obtidas, foi calculada a proporção do hormônio recuperado no final do processo de extração. A extração foi considerada eficiente quando a porcentagem de recuperação do hormônio marcado foi acima de 90%.

5.2. Determinação dos níveis hormonais

A determinação das concentrações dos hormônios foi realizada por radioimunoensaio a partir de técnicas específicas descritas por Robertson, *et al.*, (1973), Gutkowska, *et al.*, (1984), Haanwinckel, *et al.*, (1991), Castro *et al.*, (1995), Haanwinckel, *et al.*, (1995), e Botelho, *et al.*, (1994), para AVP, ANP, Corticosterona, OT e ANG I e II, respectivamente.

Objetivo: *Avaliar se a abstinência ao etanol induz alteração nos níveis plasmáticos dos hormônios: AVP, ANP, Corticosterona, OT, ANG I e II.*

6. Determinação dos níveis plasmáticos de aldosterona

O sangue foi coletado em seringas heparinizadas. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (1000 rpm, 10 min, 4 °C) e o plasma foi armazenado a -80 °C até o momento do experimento. A determinação plasmática de aldosterona foi realizada por ELISA, seguindo recomendações do kit (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit for Aldosterone*, Life Science Inc., código E90911Ra). A concentração de aldosterona foi representada como pg/mL de plasma.

Objetivo: Avaliar se a abstinência ao etanol induz alterações nas concentrações plasmáticas de aldosterona.

7. Determinação dos níveis plasmáticos de renina

O sangue foi coletado em seringas heparinizadas. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (1000 rpm, 10 min, 4 °C) e o plasma foi armazenado a -80 °C até o momento do experimento. A determinação plasmática de renina foi realizada por ELISA, seguindo recomendações do kit (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit for Renin*, Life Science Inc., código E90889Ra). A concentração de renina foi representada como pg/mL de plasma.

Objetivo: Avaliar se a abstinência ao etanol induz alterações nas concentrações plasmáticas de renina.

8. Determinação da atividade plasmática da ECA

O sangue foi coletado em seringas heparinizadas. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (1000 rpm, 10 min, 4 °C) e o plasma foi armazenado a -80 °C até o momento do experimento. Foi utilizado 5 µL de plasma e a reação foi iniciada pela adição de: 1) tampão tris (92 µ - 150 mM, pH= 8,3); 2) solução de captopril (3 µ - 10⁻² M); 3) solução do substrato Abz-Gly-p-nitro-Phe-Pro-OH (Bachem M1100) diluído em tampão tris salina (200 µ - TRIS 150 mM, pH=8,3 + NaCl 1.125 M). O período de incubação foi de 24 horas e em temperatura ambiente. Foi utilizado placa preta para a leitura em fluorímetro, com leitura de 355 nm para excitação e 400 nm para emissão. Os valores foram obtidos a partir da subtração do valor basal (obtido pela medida da amostra, tampão tris mais substrato) pelo valor obtido após

adição captopril. Os resultados expressos como URL (unidades relativa de luz) (SENTANDREU, TOLDRÁ, 2006).

Objetivo: Avaliar se a abstinência ao etanol induz alterações na atividade plasmática da ECA.

9. Evolução temporal da pressão arterial sistólica, diastólica, média e da frequência cardíaca

A pressão arterial foi determinada pelo método indireto em ratos acordados, pela técnica de pletismografia de cauda (Pletismógrafo - EFF 306 - Insight, Brasil). Dois dias antes da primeira medida, os animais foram submetidos a um período de adaptação. O procedimento consistiu em um aquecimento prévio dos animais em uma caixa com temperatura média de 37 °C por 15 minutos. Após o aquecimento, os níveis pressóricos dos ratos foram determinados através de oclusor, o qual foi ajustado à porção proximal da cauda e acoplado a um transdutor pneumático caudal elétrico conectado a um sistema de transdução. O valor final da pressão arterial e da frequência cardíaca consiste na média aritmética de três medidas sequenciais. A pressão arterial foi determinada nos três grupos experimentais, expressas como sistólica (PAS), diastólica (PAD) e média ($PAM = (PAS + (2 \times PAD)) / 3$) e representada como mmHg; a frequência cardíaca (FC) foi expressa em batimento por minuto (bpm).

Objetivo: Avaliar se a abstinência ao etanol induz alteração da pressão arterial e da frequência cardíaca.

10. Determinação dos níveis plasmáticos de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

O sangue foi coletado em seringas heparinizadas. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (1000 rpm, 10 min, 4 °C) e o plasma foi armazenado a -80 °C até o momento do experimento. A determinação das espécies reativas de oxigênio foi realizada por ELISA, seguindo recomendações do kit (TBARS Assay Kit, Cayman, código 10009055). O cálculo da

concentração de TBARS foi feito por meio de uma curva padrão de bis-malonaldeído (MDA) e representada como nmol/mL de plasma.

Objetivo: Avaliar se a abstinência ao etanol induz estresse oxidativo sistêmico.

11. Determinação da concentração tecidual do ânion superóxido (O_2^-) pelo método de quimioluminescência da lucigenina

A aorta e o leito mesentérico foram homogeneizados em tampão fosfato pH=7,4 (20 mmol/L de KH_2PO_4 , 1 mmol/L de EGTA e 150 mmol/L de sacarose). A reação foi iniciada pela adição de NAD(P)H (1 mmol/L) a uma suspensão (com volume final de 250 μ L) contendo amostra (50 μ L), lucigenina (1,25 μ mol/L) e tampão fosfato pH= 7,4. Os valores foram obtidos a partir da subtração do valor basal (obtido pela medida da amostra, tampão fosfato mais lucigenina) pelo valor obtido após adição de NAD(P)H. Foram realizados 30 ciclos de leitura durante 15 minutos em luminômetro Orion II (Berthold Detection Systems). O conteúdo proteico das amostras foi analisado pelo método de Lowry (Bio-Rad, EUA). Os resultados foram normalizados pela concentração proteica de cada amostra e expressos como URL (unidades relativa de luz) / mg de proteína (YOGI, *et al.*, 2010).

Objetivo: Avaliar se a abstinência ao etanol induz formação de O_2^- tecidual.

12. Determinação da osmolaridade plasmática

A análise da osmolaridade foi realizada em amostras de sangue coletadas por decapitação e em tubos heparinizados. A osmolaridade foi determinada pelo método do abaixamento do ponto de congelamento de água através de um Micro-osmômetro (Precision System, INC).

Objetivo: Avaliar se a abstinência ao etanol induz alteração na osmolaridade.

13. Determinação dos níveis plasmáticos de sódio

A análise das concentrações de sódio foi realizada em amostras de sangue coletado por decapitação em tubos não heparinizados para evitar a contaminação das amostras com o sódio presente no anticoagulante. Os tubos foram mantidos em temperatura ambiente por duas horas e então centrifugados (2000 rpm, 20 min, 4 °C). As dosagens de sódio foram realizadas através do fotômetro de chama (Micronal - modelo b 262). O aparelho foi calibrado previamente com solução padrão contendo 140 mEq/L de sódio diluída em água MiLiQ na proporção de 1:100.

Objetivo: Avaliar se a abstinência ao etanol induz alteração nos níveis plasmáticos de sódio.

14. Estudo funcional da reatividade vascular

Os animais foram anestesiados com uretana 1,25g/Kg em solução de 25% e a artéria aorta torácica foi isolada e cortada em anéis de 5 mm. Dois ganchos de metal foram inseridos no lúmen das artérias para produzir tensão de 1,5 g. As modificações de tônus vascular foram registradas através de sistema de aquisição de sinais TRI201 (Panlab, Espanha) e processadas pelo software ChartPro 5 (ADInstruments, Austrália). O sistema foi montado em câmara para órgão isolado contendo solução de Krebs cuja composição é (em mmol/L): NaCl: 118; KCl: 4,7; KH₂PO₄: 1,2; MgSO₄: 1,2; NaHCO₃: 15; Glicose: 5,5; CaCl₂: 2,5; pH= 7,4. Os anéis foram mantidos a uma temperatura constante de 37 °C e gaseificados com mistura carbogênica (95% O₂ e 5% CO₂). Em seguida, as artérias foram estimuladas com fenilefrina (0,1 µmol/L) até a reprodução da amplitude da resposta contrátil. O endotélio vascular foi preservado ou removido mecanicamente de acordo com o protocolo experimental. A integridade do endotélio foi testada pelo relaxamento produzido pela acetilcolina (1 µmol/L) sobre contração mantida estimulada com fenilefrina. Artérias que apresentaram relaxamento igual ou superior a 70% foram consideradas com endotélio. Para estudo com artérias sem endotélio, foram descartadas as artérias que apresentarem qualquer grau de relaxamento. A reatividade vascular foi estudada a partir da obtenção de curvas concentração-resposta para ANG II (1 fmol/L a 0,1 µmol/L), fenilefrina (10 nmol/L a 10 µmol/L), e KCl (10 a 120 mmol/L) em anéis com ou sem endotélio. As curvas para acetilcolina (10 nmol/L a 10 µmol/L) e nitroprussiato de sódio

(10 nmol/L a 10 μ mol/L) foram obtidas em anéis com e sem endotélio, respectivamente, previamente contraídos com fenilefrina (0,1 μ mol/L). A força total de contração induzidas pelos agentes contráteis foi expressa em gramas de contração e as respostas de relaxamento em % de relaxamento em relação à pré-contração com fenilefrina. A partir das curvas concentração-resposta obtidas, foram determinados os valores de pD_2 , que consiste no logaritmo negativo da concentração molar do agonista que promove 50% do efeito máximo (EC_{50}), bem como os respectivos efeitos máximos (E_{max}). As EC_{50} foram calculadas por regressão não-linear, utilizando-se o programa Prism® (GraphPad Software Corporation, EUA).

Figura 2: Esquema da cuba de órgão isolado. Anéis de aorta ficaram sob tensão de 1,5 g em solução de Krebs (pH= 7,4) a 37 °C, gaseificada com mistura carbogênica (95% O₂ / 5% CO₂).

Objetivo: Avaliar se a abstinência ao etanol induz alteração na reatividade vascular.

15. Análise estatística

Para avaliação dos testes comportamentais no LCE, foram calculadas as médias do número de entradas nos braços fechados e da porcentagem de entradas e de tempo despendido nos braços abertos em relação ao total para cada animal. Os resultados foram analisados utilizando a análise de variância de uma via (ANOVA), seguida pelo teste de Duncan. Para análise dos demais protocolos experimentais foi usada Oneway ANOVA seguida pelo pós-teste de Bonferroni. O nível de significância considerado crítico para diferenças significativas entre os grupos foi de 0,05 ($p < 0,05$).

RESULTADOS

1. Evolução temporal do peso e da ingestão alimentar e líquida dos animais

O tratamento crônico com etanol não alterou a ingestão alimentar, líquida e o ganho de peso (figura 3) dos animais do grupo EtOH e abstinência quando comparado com o grupo controle.

Figura 3: Efeito do tratamento crônico com etanol sobre o peso, sobre a ingestão alimentar e líquida. O tratamento com etanol não alterou o peso corporal de cada animal (gráfico A), a ingestão alimentar (gráfico B) e ingestão de líquido (gráfico C) dos animais do grupo EtOH e abstinência quando comparado com os animais do grupo controle. Os símbolos representam a média + e.p.m.

2. Dosagem dos níveis plasmáticos de Etanol

A concentração plasmática de etanol encontrada no grupo abstinência ao etanol ($5,6 \pm 2,8$ mg/dL, $n = 10$) foi significativamente menor quando comparado com o grupo etanol ($154,03 \pm 13,62$ mg/dL; $n = 10$); entretanto, quando comparado com o grupo controle ($1,1 \pm 0,5$ mg/dL; $n = 6$), não houve diferença significativa ($p < 0,05$; ANOVA de uma via seguida de Bonferroni).

3. Efeito da abstinência ao etanol sobre o comportamento de animais testados no LCE

Não foi encontrada nenhuma alteração significativa na exploração dos braços fechados (figura 4) entre os grupos. Em relação à atividade exploratória dos braços abertos (figura 4), observou-se uma diminuição significativa na porcentagem de frequência de entrada nos braços abertos do grupo abstinência ao etanol quando comparado com os grupos controle e etanol; no tempo despendido nos braços abertos, houve uma diminuição significativa na porcentagem de frequência de entrada nos braços abertos do grupo abstinência ao etanol quando comparado com os grupos controle e etanol.

Figura 4: Efeito da abstinência ao etanol sobre a atividade exploratória do LCE. A abstinência ao etanol diminui significativamente a atividade exploratória dos braços abertos (gráfico inferior); não houve diferença na exploração dos braços fechados (gráfico superior). As barras representam a média + e.p.m. da porcentagem/total de entradas e do tempo despendido nos braços abertos dos grupos avaliados (n=11). * diferença significativa em relação aos grupos controle e EtOH ($p < 0,05$; ANOVA de uma via seguida de Duncan).

4. Efeito da abstinência ao etanol sobre as concentrações plasmáticas de corticosterona

A concentração plasmática de corticosterona do grupo abstinência ao etanol (figura 5) foi significativamente maior quando comparada aos grupos controle e etanol.

Figura 5: Efeito da abstinência ao etanol sobre a concentração plasmática de corticosterona. A abstinência ao etanol aumentou significativamente a concentração plasmática de corticosterona. As barras representam a média (ng/mL) + e.p.m. dos diferentes grupos experimentais analisados por radioimunoensaio (n= 5 a 7). * diferença significativa em relação aos grupos controle e EtOH ($p < 0,05$; ANOVA de uma via seguida de Bonferroni).

5. Efeito da abstinência ao etanol sobre a pressão arterial sistólica, diastólica, média e a frequência cardíaca.

A pressão arterial sistólica e média do grupo abstinência ao etanol (figura 6) foi significativamente maior quando comparada ao grupo controle. Não houve alterações na pressão arterial diastólica do grupo abstinência ao etanol quando comparado ao grupo controle. Ao longo do tratamento, não foram observadas alterações na pressão arterial sistólica e diastólica ou média entre os grupos.

Em relação à frequência cardíaca (figura 6), não houve diferença no grupo abstinência quando comparado com os grupos controle e EtOH durante o tratamento.

Figura 6: Efeito da abstinência ao etanol sobre a pressão arterial sistólica, diastólica, média e a frequência cardíaca. A abstinência ao etanol aumentou significativamente a pressão arterial sistólica e pressão arterial média. Não houve diferença significativa na pressão arterial diastólica e na frequência cardíaca. Os símbolos representam a média (mmHg ou bpm) + e.p.m. dos diferentes grupos experimentais analisados por pletismografia de cauda (n= 6). * diferença significativa em relação aos grupos controle e EtOH ($p<0,05$; ANOVA de uma via seguida de Bonferroni). Setas representam o início da abstinência.

6. Efeito da abstinência ao etanol sobre a concentração plasmática de renina

Não houve diferença significativa das concentrações plasmáticas de renina (figura 7) do grupo abstinência ao etanol quando comparada com os grupos controle e etanol.

Figura 7: Efeito da abstinência ao etanol sobre a concentração plasmática de renina. Não houve diferença das concentrações plasmáticas de renina entre os grupos. As barras representam a média (pg/mL) + e.p.m. dos diferentes grupos experimentais analisados por ELISA (n= 10 a 12) (ANOVA de uma via seguida de Bonferroni).

7. Efeito da abstinência ao etanol sobre as concentrações plasmáticas de ANG I e II

Não houve diferença significativa da concentração plasmática da ANG I (figura 8) do grupo abstinência quando comparada com os grupos controle e etanol. Entretanto, observou-se um aumento significativo da concentração plasmática de ANG II (figura 8) do grupo abstinência quando comparada aos grupos controle e etanol.

Figura 8: Efeito da abstinência ao etanol sobre as concentrações plasmáticas de ANG I e II. A abstinência ao etanol aumentou a concentração plasmática de ANG II (gráfico B). Não houve diferença na concentração plasmática da ANG I (gráfico A). As barras representam a média (pg/mL) + e.p.m. dos diferentes grupos experimentais analisados por radioimunoensaio (n= 11 a 13). * diferença significativa em relação aos grupos controle e EtOH ($p < 0,05$; ANOVA de uma via seguida de Bonferroni).

8. Efeito da abstinência ao etanol sobre as concentrações teciduais de ANG I e II em aorta torácica e leito arterial mesentérico

Não houve diferença significativa nas concentrações teciduais das ANG I e II na aorta (figura 9) do grupo abstinência ao etanol quando comparada com os grupos controle e etanol.

Não houve diferença significativa das concentrações teciduais de ANG I e II no leito mesentérico (figura 9) do grupo abstinência ao etanol quando comparada com os grupos controle e etanol.

Figura 9: Efeito da abstinência ao etanol sobre as concentrações de ANG I e II em aorta torácica e leito arterial mesentérico de rato. Não houve diferença das concentrações teciduais de ANG I e II na aorta (gráficos A e B) ou no leito arterial mesentérico (gráficos C e D) entre os grupos. As barras representam a média (pg/mL) + e.p.m. dos diferentes grupos experimentais analisados por radioimunoensaio (n= 8 a 13) (ANOVA de uma via seguida de Bonferroni).

9. Efeito da abstinência ao etanol sobre a atividade plasmática da ECA

Não houve diferença significativa da atividade plasmática da ECA (figura 10) do grupo abstinência ao etanol quando comparada com os grupos controle e etanol.

Figura 10: Efeito da abstinência ao etanol sobre a atividade plasmática da ECA. Não houve diferença da atividade plasmática da ECA entre os grupos. As barras representam a média (URL) + e.p.m. dos diferentes grupos experimentais analisados por fluorescência (n= 8 a 10) (ANOVA de uma via seguida de Bonferroni).

10. Efeito da abstinência ao etanol sobre a concentração plasmática de aldosterona

Não houve diferença significativa das concentrações plasmáticas de aldosterona (figura 11) do grupo abstinência ao etanol quando comparada com os grupos controle e etanol.

Figura 11: Efeito da abstinência ao etanol sobre a concentração plasmática de aldosterona. Não houve diferença das concentrações plasmáticas de aldosterona entre os grupos. As barras representam a média (pg/mL) + e.p.m. dos diferentes grupos experimentais analisados por radioimunoensaio (n= 8 a 10) (ANOVA de uma via seguida de Bonferroni).

11. Efeito da abstinência ao etanol sobre a osmolaridade plasmática e a concentração plasmática de sódio

Não houve diferença significativa da osmolaridade plasmática (figura 12) do grupo abstinência quando comparada com os grupos controle e etanol.

Não houve diferença significativa da concentração plasmática de sódio (figura 12) do grupo abstinência ao etanol quando comparada com os grupos controle e etanol.

Figura 12: Efeito da abstinência ao etanol sobre a osmolaridade plasmática e a concentração plasmática de sódio. Não houve diferença da osmolaridade (gráfico da esquerda) plasmática entre os grupos, as barras representam a média (mOsm/Kg H₂O) + e.p.m. dos diferentes grupos experimentais analisados pelo método de abaixamento do ponto de congelamento de água (n= 6 a 8) (ANOVA de uma via seguida de Bonferroni). Não foi observada nenhuma diferença significativa na concentração plasmática de sódio (gráfico da direita) entre os grupos, as barras representam a média (mEq/L) + e.p.m. dos diferentes grupos experimentais analisados por fotômetro de chama (n= 6 a 8) (ANOVA de uma via seguida de Bonferroni).

12. Efeito da abstinência ao etanol sobre a concentração plasmática de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A concentração plasmática de TBARS (figura 13) do grupo abstinência ao etanol foi significativamente maior quando comparada aos grupos controle e etanol.

Figura 13: Efeito da abstinência ao etanol sobre a concentração plasmática de TBARS. A abstinência ao etanol aumentou a concentração plasmática de TBARS. As barras representam a média (nmol/mL) + e.p.m. dos diferentes grupos experimentais analisados por ELISA (n= 10). *diferença significativa entre os grupos controle e EtOH (p<0,05; ANOVA de uma via seguida de Bonferroni).

13. Efeito da abstinência ao etanol sobre a produção de ânion superóxido (O_2^-) em aorta e leito arterial mesentérico

Houve aumento significativo da produção de O_2^- na aorta derivado da NAD(P)H-oxidase (figura 14) no grupo abstinência ao etanol quando comparada aos grupos controle e etanol.

Não houve diferença significativa da produção de O_2^- no leito mesentérico derivado da NAD(P)H-oxidase (figura 14) no grupo abstinência ao etanol quando comparada aos grupos controle e etanol.

Figura 14: Efeito da abstinência ao etanol sobre a produção de O_2^- derivado da NAD(P)H-oxidase. A abstinência ao etanol aumentou a produção de O_2^- derivado da NAD(P)H-oxidase na aorta (gráfico da esquerda). No leito mesentérico (gráfico da direita), não houve diferença significativa entre os grupos. As barras representam a média (URL/μg de proteína) + e.p.m. dos diferentes grupos experimentais analisados pelo método da quimiluminescência da lucigenina (n= 6 a 8). * diferença significativa entre os grupos controle e EtOH (p<0,05; ANOVA de uma via seguida de Bonferroni).

14. Efeito da abstinência ao etanol sobre a concentração plasmática dos hormônios AVP, ANP e OT

Não houve diferença significativa da concentração plasmática de AVP e de ANP (figura 15) do grupo abstinência ao etanol quando comparada com os grupos controle e etanol.

Em relação a concentração plasmática de OT (figura 15), observamos uma diminuição significativa no grupo abstinência ao etanol quando comparada aos grupos controle e etanol.

Figura 15: Efeito da abstinência ao etanol sobre a concentração plasmática dos hormônios AVP, ANP e OT. A abstinência ao etanol não alterou as concentrações plasmáticas de AVP (gráfico superior esquerdo) e de ANP (gráfico superior direito). Houve diminuição significativa da concentração plasmática de OT (gráfico inferior) do grupo abstinência ao etanol quando comparado com os grupos controle e EtOH. As barras representam a média (pg/mL) + e.p.m. dos diferentes grupos experimentais analisados por radioimunoensaio (n= 6 a 8). *diferença significativa entre os grupos controle e EtOH ($p < 0,05$; ANOVA de uma via seguida de Bonferroni).

15. Reatividade Vascular

15.1. Efeito da abstinência ao etanol sobre a reatividade vascular em anéis com ou sem endotélio à ANG II

Não foram observadas alterações significativas do efeito contrátil induzido pela ANG II no grupo abstinência ao etanol em anéis com endotélio (figura 16). O Emax (gramas de contração - tabela 1) e o pD₂ (tabela 1) do grupo abstinência não apresentaram diferença significativa quando comparados com os grupos controle e etanol.

Houve redução significativa diminuição significativa do Emax (gramas de contração - tabela 1) do grupo abstinência quando comparado com os grupos controle e etanol. Em relação ao pD₂ (tabela 1) não foi observada nenhuma diferença significativa entre os grupos.

Figura 16: Efeito da abstinência ao etanol sobre a contração induzida pela ANG II. Houve diminuição significativa da contração induzida pela ANG II apenas em preparações sem endotélio. A figura da esquerda representa preparações com endotélio (E+) e a figura da direita sem endotélio (E-); os pontos representam a média + e.p.m. do efeito de concentrações específicas de ANG II (n= 5 a 7). *diferença significativa em relação aos grupos controle e EtOH (p<0,05; ANOVA de uma via seguida de Bonferroni).

Comentado [N1]: Apenas esses dados não irão para o primeiro paper!

Tabela 1: Valores de Emax (gramas de contração) e de pD₂ obtidos em curvas concentração-resposta à ANG II em preparações com e sem endotélio.

Grupos	Com endotélio		Sem endotélio	
	Emax	pD ₂	Emax	pD ₂
Controle	0,70±0,03 (7)	7,71±0,08 (7)	0,72±0,11 (5)	8,46±0,38 (5)
Etanol	0,71±0,08 (5)	7,90±0,17 (5)	0,73±0,02 (5)	8,43±0,10 (5)
Abstinência	0,74±0,06 (5)	8,04±0,21 (5)	0,42±0,04 (4)*	8,57±0,12 (4)

Os valores representam a média + o e.p.m. de cada grupo avaliado; o número entre parênteses representa o n de cada grupo. *diferença significativa comparado aos grupos controle e EtOH (p<0,05; ANOVA seguida de Bonferroni).

15.2. Efeito da abstinência ao etanol sobre a reatividade vascular em anéis com ou sem endotélio à fenilefrina

Não foram observadas alterações significativas do efeito contrátil induzido pela fenilefrina no grupo abstinência ao etanol em anéis com endotélio (figura 17). O Emax (gramas de contração - tabela 2) e o pD₂ (tabela 2) do grupo abstinência ao etanol não apresentaram diferença significativa quando comparados com os grupos controle e etanol.

Entretanto, houve diferença significativa do efeito contrátil induzido pela fenilefrina no grupo abstinência em anéis de aorta sem endotélio (figura 17). Observou-se uma diminuição significativa do Emax (gramas de contração - tabela 2) do grupo abstinência ao etanol quando comparado com os grupos controle e etanol. Em relação ao pD₂ (tabela 2) não foi observada nenhuma diferença significativa entre os grupos.

Figura 17: Efeito da abstinência ao etanol sobre a contração induzida pela fenilefrina. Houve diminuição significativa da contração induzida pela fenilefrina em anéis sem endotélio do grupo abstinência ao etanol. A figura da esquerda representa preparações com endotélio (E+) e a figura da direita sem endotélio (E-); os pontos representam a média + e.p.m. do efeito de concentrações específicas de fenilefrina (n= 10 a 14). *diferença significativa em relação aos grupos controle e EtOH (p<0,05; ANOVA de uma via seguida de Bonferroni).

Tabela 2: Valores de Emax (gramas de contração) e de pD₂ obtidos em curvas concentração-resposta à fenilefrina em preparações com e sem endotélio.

Grupos	Com endotélio		Sem endotélio	
	Emax	pD ₂	Emax	pD ₂
Controle	1,26±0,08 (10)	6,78±0,04 (10)	1,75±0,13 (10)	7,19±0,12 (10)
Etanol	1,39±0,11 (11)	7,00±0,12 (11)	1,76±0,17 (14)	7,39±0,11 (14)
Abstinência	1,30±0,09 (11)	7,13±0,11 (10)	1,14±0,10 (12) *	7,58±0,68 (12)

Os valores representam a média + o e.p.m. de cada grupo avaliado; o número entre parênteses representam o n de cada grupo. *diferença significativa comparado aos grupos Controle e EtOH (p<0,05; ANOVA seguida de Bonferroni).

15.3. Efeito da abstinência ao etanol sobre a reatividade vascular em anéis de aorta com ou sem endotélio ao KCl

Não foram observadas alterações significativas do efeito contrátil induzido pelo KCl no grupo abstinência em anéis com endotélio (figura 18). O Emax (gramas de contração -

tabela 3) e o pD_2 (tabela 3) do grupo abstinência não apresentaram diferença significativa quando comparados com os grupos controle e etanol.

Entretanto, houve diferença significativa do efeito contrátil induzido o KCl no grupo abstinência em anéis de aorta sem endotélio (figura 18). Observou-se uma diminuição significativa do E_{max} (gramas de contração - tabela 3) do grupo abstinência quando comparado com os grupos controle e etanol. Em relação ao pD_2 (tabela 3) não foi observada nenhuma diferença significativa entre os grupos.

Figura 18: Efeito da abstinência ao etanol sobre a contração induzida pelo KCl. Houve diminuição significativa da contração induzida pelo KCl apenas em preparações sem endotélio. A figura da esquerda representa preparações com endotélio (E+) e a figura da direita sem endotélio (E-); os pontos representam a média + o e.p.m. do efeito de concentrações específicas de KCl (n= 5 a 8). * diferença significativa em relação aos grupos controle e EtOH ($p<0,05$; ANOVA de uma via seguida de Bonferroni).

Tabela 3: Valores de Emax (gramas de contração) e de pD₂ obtidos em curvas concentração-resposta ao KCl em preparações com e sem endotélio.

Grupos	Com endotélio		Sem endotélio	
	Emax	pD ₂	Emax	pD ₂
Controle	1,66±0,09 (8)	1,76±0,02 (8)	1,97±0,19 (7)	1,82±0,04 (7)
Etanol	1,48±0,16 (16)	1,94±0,06 (6)	1,75±0,26 (5)	1,80±0,07 (5)
Abstinência	1,43±0,12 (8)	1,96±0,11 (8)	1,25±0,13 (8)*	1,97±0,11 (8)

Os valores representam a média + o e.p.m. de cada grupo avaliado; o número entre parênteses representam o n de cada grupo *diferença significativa em relação aos grupos controle e EtOH (p<0,05; ANOVA seguida de Bonferroni).

15.4 Efeito da abstinência ao etanol sobre a reatividade vascular à acetilcolina e ao nitroprussiato de sódio

Não foram observadas alterações significativas da porcentagem de relaxamento induzido pela acetilcolina em anéis com endotélio no grupo abstinência ao etanol quando comparado com os grupos controle e EtOH (figura 19). A porcentagem de relaxamento (tabela 3) e o pD₂ (tabela 3) do grupo abstinência ao etanol não apresentaram diferença significativa quando comparados com os grupos controle e etanol.

Entretanto, observamos alterações significativas no relaxamento induzido pelo NPS (figura 19). Houve aumento significativo porcentagem de relaxamento nos animais do grupo abstinência ao etanol quando comparado com os grupos controle e EtOH. Em relação ao pD₂ (tabela 3) não foi observada nenhuma alteração significativa entre os grupos.

Figura 19: Efeito da abstinência sobre o relaxamento induzido pela acetilcolina e pelo NPS. Não houve alteração significativa no relaxamento induzido pela acetilcolina em anéis com endotélio (E+). Houve aumento significativo no relaxamento induzido pelo NPS no grupo abstinência ao etanol quando comparado com os grupos Controle e Etanol. Os pontos representam a média + o e.p.m. do efeito de concentrações específicas de acetilcolina e NPS (n= 7 a 10). *diferença significativa em relação aos grupos controle e EtOH (p<0,05; ANOVA seguida de Bonferroni).

Tabela 4: Valores de % de relaxamento de relaxamento e de pD₂ obtidos em curvas concentração-resposta à acetilcolina e ao nitroprussiato de sódio em preparações com/sem endotélio.

Grupos	Acetilcolina/Com endotélio		NPS/Sem endotélio	
	E _{max}	pD ₂	E _{max}	pD ₂
Controle	120,7±3,98 (10)	7,6±0,16 (10)	119,7±2,61 (11)	8,4±0,16 (11)
Etanol	108,4±9,32 (7)	7,5±0,26 (6)	125,3±2,64 (6)	8,0±0,07 (6)
Abstinência	115,3±6,99 (6)	7,7±0,26 (6)	131,1±1,50 (7)*	8,1±0,11 (7)

Os valores representam a média + o e.p.m. de cada grupo avaliado; o número entre parênteses representam o n de cada grupo. *diferença significativa em relação aos grupos controle e EtOH (p<0,05; ANOVA seguida de Bonferroni).

Denomina-se alcoolemia a concentração de etanol no sangue. O consumo de uma dose de bebida alcoólica (equivalente a 14g de etanol) resulta, em média, em uma concentração de 20 mg/dL (MOURA, MALTA, et al., 2009). Segundo a Associação Médica Americana (The American Medical Association) uma concentração de etanol de 0,04 gramas/100 mililitros de sangue é o suficiente para trazer prejuízos à saúde do indivíduo. Em nosso trabalho foi observado uma concentração média de $154,03 \pm 1,3$ mg/dL ($\sim 33,44$ mmol/L) de etanol no plasma dos animais que foram tratados cronicamente com etanol por 21 dias. A etanolemia dos animais tratados com etanol estão dentro da faixa encontrada no sangue de ratos tratados com etanol (cerca de 24 a 50 mMol/L) (CHABIELSKA, PIETRASZEK, et al., 1988; SCHLORFF, HUSAIN e SOMANI, 1999; IZBÉKI, WITTMANN, et al., 2001) e em indivíduos alcoólatras crônicos (cerca de 150 mg/dL (URSO, GAVALER e VAN THIEL, 1981). Nos animais em abstinência, observamos também que o período de 48 horas de abstinência foi suficiente para que os níveis plasmáticos de etanol fossem reduzidos a $5,7 \pm 0,28$ mg/dL ($\sim 0,12$ mmol/L). Portanto, uma vez que houve grande redução da concentração de etanol, os resultados obtidos neste trabalho são referentes aos efeitos da abstinência ao etanol e não aos efeitos do etanol no sistema cardiovascular.

Avaliamos, inicialmente, se o protocolo experimental utilizado para gerar a abstinência ao etanol seria capaz de induzir os sintomas comportamentais já descritos na literatura (KOOB e BRITTON, 1996; MONTEIRO, 2004; ALVES, KESSLER e RATTO, 2004; PADOVAN, 2010).

A avaliação do efeito da abstinência ao etanol sobre o comportamento dos animais testados no LCE, demonstrou que a retirada do etanol induziu uma diminuição da atividade exploratória dos braços abertos. Os animais em abstinência apresentaram uma diminuição nas porcentagens de frequência de entrada nos braços abertos e do tempo despendido nestes braços. Segundo Pellow *et al.* (1985), esta diminuição da atividade exploratória dos braços abertos pode ser descrito como um padrão de resposta ansiogênica. Além disso, corroborando com nossos dados, estudos anteriores apresentaram o mesmo padrão de resposta ansiogênica após a retirada do etanol (POKK, SEPP, *et al.*, 2001; KLIETHERMES, 2005; ZHANG, MORSE, *et al.*, 2007; PADOVAN, 2010). Em relação à atividade exploratória dos braços fechados, não foi observado nenhuma alteração significativa entre os grupos avaliados. É importante ressaltar que a diminuição da exploração dos braços abertos não pode ser atribuída

como efeito secundário ao tratamento crônico de etanol, uma vez que não houve alteração na atividade exploratória dos braços fechados (CABRAL, ISOARDI, *et al.*, 2006).

Além do aumento dos níveis de ansiedade evidenciado pelo teste do LCE, observamos também um aumento significativo dos níveis plasmáticos de corticosterona nos animais em abstinência. Segundo a literatura, a retirada abrupta do etanol após um período de consumo crônico pode ser reconhecida como um evento estressor para os animais. Além disso, a exposição a estressores incontroláveis é mediada pela ansiedade reconhecida no córtex cerebral, sendo que o principal mecanismo endócrino é a ativação do eixo-HPA, resultando em aumento da circulação de corticosterona (DALLMAN e JONES, 1973; DALLMAN, AKANA, *et al.*, 1992; AKANA e DALLMAN, 1997; VAN DE KAR e BLAIR, 1999). Ainda, em estudos clínicos, há um aumento na ativação do eixo-HPA, resultando em concentrações elevadas de cortisol durante a abstinência ao etanol (RISHER-FLOWERS, ADINOFF, *et al.*, 1988; ADINOFF, RISHER-FLOWERS, *et al.*, 1991; ADINOFF, IRANMANESH, *et al.*, 1998)

Já está bem descrito a associação entre o consumo de etanol e a elevação da pressão arterial e que as alterações cardiovasculares dependem da duração e da quantidade de etanol consumida, do tempo da última dose e em alguns casos de fatores étnicos (LIAN, 1915; ALTURA, ZOU e ALTURA, 1996; YOSHITA, MIURA, *et al.*, 2005). Indivíduos que consomem etanol regularmente apresentam um risco aumentado para o desenvolvimento da hipertensão arterial (MacMAHON, 1987; YOSHITA, MIURA, *et al.*, 2005; SESSO, COOK, *et al.*, 2008; SKLIROS, PAPADODIMA, *et al.*, 2012). Entretanto, estes trabalhos utilizaram tempo de tratamento e/ou concentrações de etanol diferentes. Por exemplo, ratos tratados com solução de etanol 20% apresentaram aumento da pressão sistólica após a quarta semana de tratamento (CHAN e SUTTER, 1983; CHAN e SUTTER, 1985; STRICKLAND e WOOLLES, 1988). Além disso, Abdel-Rahman *et al.*, (1985) observaram que o tratamento com etanol por 30 dias não foi suficiente para induzir aumento da pressão arterial. Portanto, é evidente que o período de tratamento e a concentração de etanol são fatores importantes no desenvolvimento das alterações cardiovasculares induzidas pelo consumo de etanol. Em nosso trabalho, o qual foi delineado com objetivo de estudar o efeito da abstinência ao etanol sobre as funções cardiovasculares, o tratamento crônico com uma solução de etanol 9% por 21 dias não induziu alterações na pressão arterial. Assim, nosso trabalho está de acordo com a relação entre a dose

e a duração do consumo com as alterações cardiovasculares induzidas pelo consumo de etanol.

Em nosso trabalho, observamos também, que a abstinência ao etanol foi capaz de induzir o desenvolvimento da hipertensão arterial secundária, representa por um aumento da pressão arterial sistólica e da pressão arterial média. Apesar de não observamos aumento da pressão arterial diastólica e considerando que a hipertensão arterial pode ser caracterizada pela pressão arterial sistólica ≥ 150 mmHg (KLATSKY, FRIEDMAN, *et al.*, 1977; MacMAHON, BLACKET, *et al.*, 1984), nossos dados estão de acordo com a literatura que mostra um aumento da pressão arterial em indivíduos em abstinência (BECKMAN, FRANK, *et al.*, 1981; KAHKONEN e BONDARENKO, 2004; CECCANTI, SASSO, *et al.*, 2006; KAHKONEN, ZVARTAU, *et al.*, 2011). Entretanto, pouco se sabe a respeito do mecanismo pelo qual a abstinência ao etanol induz hipertensão arterial (BALSTER, WILEY e TOKARZ, 1993; CECCANTI e BALDUCCI, 1996). Estudos anteriores sugerem, por exemplo, uma ativação do eixo-HPA (RANDIN, VOLLENWEIDER e TAPPY, 1995); participação dos canais para cálcio do tipo-L regulando o tônus vascular (KAHKONEN e BONDARENKO, 2004); envolvimento do óxido nítrico (ADAMS, SEWING, *et al.*, 1995).

A partir dos resultados obtidos em nosso trabalho, sugerimos que a estimulação do SRAA pela abstinência ao etanol, atue como mediador do desenvolvimento da hipertensão arterial. Considerando que este sistema envolve múltiplos mediadores, receptores e mecanismos de sinalização intracelular variados e que o SRAA clássico tem início na ação da enzima renina circulante sobre o angiotensinogênio para produzir ANG I (SANJULIANI, TORRES, *et al.*, 2011), avaliamos, inicialmente, o efeito da abstinência ao etanol sobre a concentração plasmática de renina. Observamos que a abstinência ao etanol não induziu alterações nos níveis plasmáticos de renina. Em relação a influência da abstinência ao etanol sobre a concentração plasmática de renina não encontramos, na literatura, trabalhos que mostrem essa associação. Entretanto, diversos trabalhos avaliaram o efeito da abstinência ao etanol sobre a atividade da renina plasmática (ARP). Porém os resultados destes estudos são contraditórios, por exemplo, Potter *et al.* (1983) mostraram um aumento na ARP, enquanto que Di Gennaro *et al.* (2012) mostraram uma diminuição da ARP; ainda, Soardo *et al.* (2006) mostraram que a abstinência ao etanol não induz alteração na ARP. Sabe-se que são diversos os fatores que podem influenciar na secreção de renina e nos níveis plasmáticos APR (RODRIGUES e ALMEIDA, 2002). Apesar dos níveis de APR serem utilizados como

marcadores da atividade do SRAA, entendemos que, utilizar a APR para sugerir a ativação do SRAA pela abstinência ao etanol, seria talvez, uma forma inadequada e simplificada deste complexo mecanismo endócrino. Além disso, observamos que as concentrações plasmáticas e teciduais de ANG I não foram alteradas pela abstinência ao etanol.

Na sequência da cascata de formação e degradação do SRAA, a ANG I é convertida em ANG II pela ação da enzima conversora de angiotensina. Sabe-se que essa conversão existe em nível sistêmico bem como em tecidos, como por exemplo, em músculo liso vascular e que este pode agir de forma independente do SRAA sistêmico para gerar ANG II (TOUYZ e BERRY, 2002; CAT e TOUYZ, 2011). Portanto, a partir disso, avaliamos os níveis plasmáticos e teciduais de ANG I e II. Observamos que a abstinência ao etanol foi capaz de aumentar significativamente apenas as concentrações plasmáticas de ANG II e que este aumento não foi observado na aorta ou no leito mesentérico. Nossos dados estão de acordo com dados encontrados na literatura, por exemplo, Döring et al. (2003) demonstraram que em indivíduos em abstinência por 24 horas o nível de ANG II sistêmico estava aumentado. Como mencionado anteriormente não foi encontrado alterações teciduais da ANG I e II.

Uma vez que observamos aumento nas concentrações plasmáticas de ANG II, optamos então, por avaliar a atividade plasmática da ECA. Embora já esteja bem descrito que, a ECA é o maior e, certamente, o determinante final da produção de ANG II na circulação e em muitos tecidos (SANJULIANI, *et al.*, 2011), em nosso trabalho avaliamos apenas a via clássica de formação de ANG II e não observamos alteração na atividade da ECA. Entretanto, estudos anteriores têm demonstrado que a produção da ANG II pode ocorrer através da participação de outras enzimas, além da ECA (CAMPBELL, *et al.*, 1987; BALCELLS, *et al.*, 1997; TAKAI, *et al.*, 2001). A via alternativa, chamada de via não-clássica ou não-canônica, de formação de ANG II presente em diversos tecidos, envolve a participação da quimases (URATA, *et al.*, 1990b), da catepsina G (TONNESEN, *et al.*, 1982) e da tonina (BOUCHER, *et al.*, 1974). Uma vez que a abstinência ao etanol induziu aumento dos níveis plasmáticos de ANG II e sem alterar a atividade plasmática da ECA, excluímos a participação da via clássica de formação de ANG II nos efeitos induzidos pela abstinência ao etanol sobre o SRAA. Porém, seriam necessários novos experimentos com a utilização de inibidores específicos da ECA e das outras enzimas que participam da formação de ANG II para melhor esclarecer a participação das vias alternativas nos efeitos induzidos pela abstinência ao etanol.

Comentado [N2]: Carlos, essa é a discussão que fiz para o resultado da ECA. Não acrescentei as NEP pois elas clivam ANG II em Ang 1-7. As que eu citei são as que participam da formação de ANG I: a tonina e a catepsina a partir do angiotensinogenio e as quimases a partir da ANG I.

Sabe-se que a ANG II atua aumentando o volume sanguíneo por estimular a liberação de aldosterona na zona glomerulosa renal (FERRARIO, SANTOS, *et al.*, 1988). Por isso avaliamos os níveis plasmáticos de aldosterona. Nossos resultados mostram que a abstinência ao etanol não foi capaz de induzir alteração nos níveis plasmáticos de aldosterona. Diferentes estudos presentes na literatura mostram o efeito da abstinência ao etanol sobre os níveis plasmáticos de aldosterona, entretanto estes resultados diferem entre si (POTTER, BANNAN, *et al.*, 1983; BANNAN, POTTER, *et al.*, 1984; MANDER, YOUNG, *et al.*, 1989). A principal diferença entre estes estudos é a o período de abstinência em que as concentrações plasmáticas de aldosterona foram avaliadas. Por exemplo, Bezzegh *et al.* (1991) demonstraram que ocorre um aumento dos níveis plasmáticos de aldosterona após 24 horas de abstinência. Por outro lado, Soardo *et al.* (2006), mostraram que ocorre uma diminuição significativa da concentração plasmática de aldosterona após um período de 30 dias. Assim, poderíamos sugerir que a alteração nos níveis plasmáticos de aldosterona modifica em função do tempo de abstinência ao etanol. Além disso, nossos dados de aldosterona estão de acordo com os resultados da concentração plasmática de sódio, uma vez que não observamos alteração induzida pela abstinência ao etanol nesse parâmetro.

O SRAA é responsável por controlar diversos mecanismos responsáveis pelo controle da pressão arterial, como por exemplo, o controle da volemia, seguida de uma maior excreção de sódio proveniente de uma rápida queda da osmolaridade plasmática (ANTUNES-RODRIGUES *et al.*, 2004). Além disso, o controle de volume e osmolaridade dos fluidos do corpo dos mamíferos pode ocorrer também em resposta aos estímulos que surgem dos compartimentos intra e extracelulares, resultando na secreção da vasopressina (AVP) e ocitocina (OT) pela neuro-hipófise e secreção de peptídeos natriuréticos (ANP) pelo coração (RUGINSK, DA SILVA, *et al.*, 2009). O AVP é conhecido principalmente por seus efeitos antidiuréticos, mas também está envolvido nas respostas cardiovasculares e termorregulação (STEINER e BRANCO, 2002). A ativação dos receptores para vasopressina (V_2) nos rins leva ao aumento da permeabilidade à água e consequente reabsorção de fluido ao longo do néfron distal. A OT age diretamente sobre os rins para promover a excreção de sódio ou indiretamente, estimulando a liberação de ANP do coração (SOARES, COIMBRA, *et al.*, 1999; JANKOWSKI, HAJJAR, *et al.*, 1998). O ANP é sintetizado pelos cardiomiócitos atriais e secretado sob o estímulo do estiramento da parede do átrio direito, geralmente consequência do aumento da volemia (DIETZ, 2005). Uma vez na corrente sanguínea, o ANP

exerce um potente efeito natriurético, agindo sobre o túbulo contorcido distal do néfron (DE BOLD, BORENSTEIN, *et al.*, 1981; POLLOCK e BANKS, 1983). Em nosso trabalho não observamos alteração na osmolaridade, na concentração plasmática de sódio, de AVP ou de ANP. Nossos dados estão de acordo com estudos anteriores que mostraram que a abstinência não é capaz de induzir alteração na osmolaridade, na concentração plasmática de sódio e de ANP (DÖRING, HERZENSTIEL, *et al.*, 2003) e de AVP (MARCHESI, CHIODERA, *et al.*, 1997). Além disso, considerando que a ativação do SRAA é responsável também por controlar a homeostasia hidroeletrólítica (NIEMINEM, FYHRQUIST, *et al.*, 1981; YOGI *et al.*, 2012), a partir destes resultados podemos sugerir que a abstinência ao etanol, apesar de estimular o SRAA, não foi capaz de alterar a homeostase hidroeletrólítica dos animais abstêmios. Entretanto, em relação a OT, nossos resultados demonstraram uma diminuição no grupo abstinência. Estes resultados divergem com resultados de estudos anteriores que demonstraram um aumento nas concentrações plasmáticas de OT em indivíduos após 48 horas de abstinência (LEGROS, DECONICK, *et al.*, 1993; MARCHESI, CHIODERA, *et al.*, 1997). Apesar de não nossos resultados não estarem de acordo com o presente na literatura, é necessário ressaltar que o estudo mencionado foi realizado com indivíduos em abstinência e que talvez o efeito da abstinência ao etanol sobre a OT observado não possa ser reproduzido em ratos. Além disso, nossos dados de OTestão de acordo com os resultados da concentração plasmática de sódio e ANP, uma vez que não observamos alteração induzida pela abstinência ao etanol nesses parâmetros.

Por outro lado, a estimulação do SRAA pela abstinência ao etanol e o consequente aumento das concentrações plasmáticas de ANG II poderia levar ao quadro de estresse oxidativo. Segundo a literatura, o estresse oxidativo pode ocorrer pelo aumento da produção de ERO devido a ativação de receptores AT_1 pela ANG II com consequente ativação da enzima NAD(P)H-oxidase (RAJAGOPALAN *et al.*, 1996; ZAFARI *et al.*, 1998; WARNHOLTZ, NICKENIG e SCHULZ, 1999; TOUYZ e SCHIFFRIN, 2000). Estudos anteriores utilizaram o aumento de malondialdeído (MDA) para avaliar o estresse oxidativo sistêmico em resposta à abstinência ao etanol (JANERO, 1990; BENZIE, 1996; HALLIWELL, 2000). O MDA é um dialdeído, formado como um produto secundário durante a oxidação de ácidos graxos poliinsaturados, que em meio ácido e temperatura elevada reage com moléculas de ácido tiobarbitúrico (JANERO, 1990; LEFÈVRE, BELJEAN-LEYMARIE, *et al.*, 1998). Em nossos resultados, observamos que a concentração de MDA é

significativamente maior no plasma de animais abstêmios, ou seja, podemos sugerir que a abstinência ao etanol induziu aumento do estresse oxidativo sistêmico. Corroborando com nossos resultados, estudos clínicos presentes na literatura mostram que os níveis de MDA encontram-se elevados em pacientes após o período de 24 horas de abstinência (PENG, TANG, *et al.*, 2005; YUKSEL, UZBAY, *et al.*, 2005).

A produção de ERO induzida pela ANG II ocorre pela ativação de receptores AT₁ com consequente ativação da enzima NAD(P)H-oxidase (RAJAGOPALAN *et al.*, 1996; ZAFARI *et al.*, 1998; WARNHOLTZ, NICKENIG e SCHULZ, 1999; TOUYZ e SCHIFFRIN, 2000). A NAD(P)H-oxidase é uma enzima de membrana que catalisa a formação de ERO através da redução de O₂, usando NADH ou NAD(P)H-oxidase como doador de elétron, e gera como produto final o O₂⁻ (GRIENDLING, SORESCU e USHIO-FUKAI, 2000). Observamos, em nosso trabalho, que a abstinência ao etanol foi capaz de aumentar a produção de O₂⁻ derivado da atividade da NAD(P)H-oxidase em tecido aórtico. É possível sugerir que o aumento da atividade da NAD(P)H-oxidase, ativada pela ANG II, seja o mecanismo responsável pelo aumento das ERO. Uma vez que diversos estudos associam o aumento de ANG II com a ativação da NAD(P)H-oxidase e consequente formação de ERO (POLIKANDRIOTIS, RUPNOW, *et al.*, 2006; VASCONCELOS, GOULART, *et al.*, 2007; HUSAIN, VASQUEZ, *et al.*, 2008). No entanto, estudos utilizando inibidores da via da ANG II ou antagonistas do receptor AT₁ são necessários para comprovar essa hipótese.

Estudo do nosso grupo de pesquisa demonstrou que o consumo crônico de etanol pode promover diferentes respostas em diferentes tecidos, como por exemplo, em tecidos de condutância (aorta) e de resistência (leito arterial mesentérico) (TIRAPELLI, LEONE, *et al.*, 2007). Considerando que o objetivo do nosso trabalho foi o de avaliar o efeito da abstinência ao etanol sobre a vasculatura, avaliamos a produção de ERO e os níveis de ANG I e II, em aorta e em leito arterial mesentérico. As alterações observadas e anteriormente descritas ocorreram apenas em aorta, portanto, podemos sugerir que a produção de O₂⁻ derivado da atividade da NAD(P)H-oxidase em tecido induzida pela abstinência ao etanol, ocorra apenas em vasos de condutância e que a abstinência ao etanol não é capaz de induzir alterações na produção tecidual de ANG I e II.

Além disso, alguns trabalhos sugerem que a abstinência ao etanol também induza alterações cardiovasculares, como por exemplo, taquicardia e hipertensão (CARLSSON,

1971; BECKMAN, FRANK, *et al.*, 1981; SAUNDERS, BEVERS e PATON, 1981; CLARK e FRIEDMAN, 1985). Entretanto, na literatura não há estudos que mostrem os efeitos da abstinência ao etanol sobre a função vascular. Portanto, em nosso trabalho avaliamos, inicialmente, os efeitos da abstinência ao etanol sobre a contração induzida pela ANG II e observamos uma diminuição significativa no Emax de contração apenas em preparações sem endotélio. Já está bem estabelecido que a ANG II possui seu efeito contrátil desencadeado pela ativação do receptor AT₁, um receptor acoplado à proteína G, que quando ativado, estimula várias vias intracelulares de transdução de sinal, levando a contração vascular. A ativação do receptor AT₁ estimula a fosfolipase C, induzindo a formação de trifosfato de inositol (IP₃) e diacilglicerol (DAG), o que promove aumento dos níveis citoplasmáticos de Ca²⁺, levando à ativação da proteína quinase C (PKC) e da adenilil ciclase (LEE, BOHM, *et al.*, 1993).

A partir destes resultados, observamos que a abstinência ao etanol é capaz de induzir alteração na resposta à ANG II de forma independente de endotélio. Para indicarmos o mecanismo pelo qual ocorre diminuição da contração vascular observada, seria necessário novos experimentos de reatividade vascular utilizando inibidores de vias específicas. Contudo, poderíamos sugerir que a abstinência ao etanol possa estimulando vias de relaxamento intrínsecas ao músculo liso vascular, como por exemplo, através da indução da iNOS, da produção de prostanoídes vasodilatadores ou através da estimulação de canais para K⁺; por outro lado,

A partir destes resultados, observamos que a abstinência ao etanol é capaz de induzir alteração na resposta à ANG II de forma independente de endotélio. Para indicarmos o mecanismo pelo qual ocorre diminuição da contração vascular observada, seria necessário novos experimentos de reatividade vascular utilizando inibidores de vias específicas. Porém, diante dos resultados observados, podemos sugerir que a abstinência ao etanol esteja estimulando vias de relaxamento intrínsecas ao músculo liso vascular. Por exemplo, Israel *et al.* (2000) sugerem que o relaxamento muscular induzido pelo aumento da ANG II envolva a participação de NO. A síntese de NO no músculo liso vascular ocorre pela ação das óxido nítrico sintase (NOS); são três as isoformas da óxido nítrico sintase (NOS): duas isoformas são constitutivas, a NOS endotelial (eNOS ou NOS-3) e a NOS neuronal (nNOS ou NOS-1) e uma isoforma induzível, a NOS induzível (iNOS ou NOS-2). Dentre as diferenças já descritas na literatura, podemos citar como importante, o fato de que diferentemente das isoformas

constitutivas, a iNOS não é regulada pelo cálcio e que a síntese de NO ocorre em maiores proporções pela iNOS do que pelas isoformas constitutivas (DUSSE, VIEIRA e CARVALHO, 2003). A molécula de NO é sintetizada por um curto período de tempo (segundos a minutos) quando decorrente da ativação enzimática da eNOS ou nNOS. Em contraste, a iNOS só se expressa depois da ativação celular e então produz NO relativamente por um longo período de tempo (horas a dias) (VIARO, NOBRE e EVORA, 2000). A iNOS não é expressa constitutivamente, ou seja, não está presente de modo habitual, sendo induzida nos macrófagos e outras células por lipopolissacarídeos bacterianos e/ou citocinas (STUERH, CHO, *et al.*, 1991). Estudos anteriores, clonaram a iNOS também em músculo liso (TENG, MURTHY, *et al.*, 1998), hepatócitos de camundongo (STUERH, CHO, *et al.*, 1991) e em hepatócitos humanos (SHAPIRO, NUSSLER, *et al.*, 1993). Entretanto, pouco se sabe a cerca das ações da iNOS nos diferentes tecidos em que é encontrada e também nos diferentes modelos experimentais; contudo, vários autores consideram que qualquer célula do organismo tem a capacidade de produzir iNOS sob estímulos apropriados e que uma vez induzida, a iNOS é capaz de produzir NO (FOSTERMANN e KLEINER, 1995; FILHO e ZILBERSTEIN, 2000). Assim, poderíamos sugerir que a abstinência ao etanol seja capaz de promover a indução da iNOS.

Como descrito anteriormente, os efeitos do receptor AT₂ contrapõem os efeitos do receptor AT₁ (HORIUCHI, AKISHITA e DZAU, 1999). Assim, poderíamos sugerir também, que a diminuição da função contrátil observada, poderia estar relacionada com produção de prostanóides vasodilatadores. Para Israel *et al.* (2000) os receptores AT₂ podem promover relaxamento muscular via prostanóides vasodilatadores. Os compostos vasodilatadores provenientes do metabolismo do ácido araquidônico, como a prostaciclina (PGI₂) que induz relaxamento vascular (CHERRY, FURCHGOTT, *et al.*, 1982; FORSTERMANN, HERTTING e NEUFANG, 1986). O efeito vasodilatador da PGI₂ ocorre pela ativação da adenilil ciclase e aumento nos níveis de AMPc (VANE, ANGGARD e BOTTING, 1990). O AMPc ativa a PKA que atua na fosforilação de diversas proteínas que diminuem o influxo de Ca²⁺ e a sensibilidade ao Ca²⁺, e aumentam a captação do Ca²⁺ do meio intracelular para o interior do retículo sarcoplasmático, levando ao relaxamento do músculo liso vascular (WERSTIUK e LEE, 2000). Segundo a literatura, a síntese desse prostanóide ocorre em maior proporção no endotélio do que no músculo liso vascular. Entretanto estudos mostram que a artéria aorta de ratos produz PGI₂ (STANKE-LABESQUE, MALLARET, *et al.*, 2004) e que

a prostaciclina promove vasodilatação em diversos leitos vasculares, estimulando receptores de prostaciclina e aumentando a concentração intracelular de AMP cíclico (LOUREIRO-SILVA, MOLINA e BORGES, 1999; CAMACHO, 2011; MOHITE, 2011; DORRIS e PEEBLES, 2012).

Posteriormente, para compararmos a resposta encontrada para a ANG II, avaliamos a resposta contrátil induzida pela fenilefrina. Observamos que a abstinência ao etanol induziu um mesmo perfil de resposta à fenilefrina, ou seja, houve uma diminuição do Emax de contração apenas em anéis sem endotélio. Já está bem descrito que a fenilefrina induz a produção de IP_3 , o qual ativa receptores IP_3 (ECKERT, KARSTEN, *et al.*, 2000), responsáveis por mediar liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático para a contração do músculo liso vascular, promovendo contração do músculo liso vascular por aumentar os níveis de Ca^{2+} citosólico (KARAKI, OZAKI, *et al.*, 1997). A contração ocorre devido a formação do complexo Ca^{2+} -calmodulina (ARAUJO e BENDHACK, 2003); este complexo sofre uma alteração conformacional e ativa a quinase da cadeia leve de miosina (MLCK), responsável pela fosforilação da cadeia leve de miosina (MLC). Esta última quando fosforilada interage com os filamentos de actina com consequente contração do músculo (WALSH, 1994).

Ao avaliar a contração induzida pelo KCl, encontramos também uma diminuição do Emax de contração induzida pela abstinência ao etanol. O mecanismo de ação de contração induzido pelo KCl envolve altas concentrações de K^+ que levam a despolarização da membrana (KARAKI, OZAKI, *et al.*, 1997), com consequente aumento do influxo de Ca^{2+} através de canais sensíveis a voltagem (GODFRAIND e KABA, 1969; (SOMLYO e SOMLYO, 1994). A partir desse resultado, podemos sugerir que a abstinência ao etanol altere a mobilização de Ca^{2+} do meio extra para o meio intracelular. Corroborando com este resultado, Dimitropoulou *et al.* (2001), sugerem que o relaxamento induzido pela abstinência envolva a participação dos canais para K^+ . A abertura destes canais membrana celular aumenta a saída de K^+ causando hiperpolarização da membrana e levando, consequentemente, à vasodilatação (NELSON e QUAYLE, 1995). As células do músculo liso vascular expressam diferentes tipos de canais para K^+ (KURIYAMA, KITAMURA e NABATA, 1995): os sensíveis a voltagem e ao ATP e os de alta e baixa condutância ativados pelo Ca^{2+} . Assim, o mecanismo de relaxamento induzido pelos canais para K^+ presentes no músculo liso

Comentado [N3]: Carlos, optei por deixar essa parte aqui...pois como os professores disseram na defesa do Ulisses...é o que eu acho que pode estar acontecendo e acho que essas idéias estão bem escritas e fundamentadas em trabalhos já presentes na literatura. Então, vou deixar!

vascular pode ser também um dos mecanismos responsáveis pela resposta induzida pela abstinência ao etanol.

Em relação a função vascular de relaxamento, observamos um aumento significativo da porcentagem de relaxamento induzido pelo NPS (IGNARRO, BYRNS, *et al.*, 1987); o mesmo não foi observado para a acetilcolina. O NPS atua como um doador de NO, o qual difunde-se nas células do músculo liso vascular e atua na enzima guanilil ciclase solúvel (GCs) (MURAD, 1994). Quando estimulada, a GCs promove a conversão do nucleotídeo GTP em GMPc (IGNARRO, BYRNS, *et al.*, 1987). Por sua vez, o GMPc promove relaxamento através da ativação de uma cascata de reações intracelulares, induzindo a redução da concentração citoplasmática de íons Ca^{2+} (McDANIEL, CHEN, *et al.*, 1992), abertura dos canais para K^+ . Em conjunto, estes eventos são responsáveis por promover hiperpolarização da membrana e inibição de canais para Ca^{2+} dependentes de voltagem (MIYOSHI, NAKAYA e MORITOKI, 1994) e a desfosforilação da cadeia leve de miosina (MURAD, 1996). O que sugere que a abstinência ao etanol não afeta o NO endotelial mas afeta sua via de sinalização intracelular no músculo liso vascular. Portanto, um aumento da sinalização do NO poderia explicar a hiperreatividade observada no relaxamento.

Em conjunto, a partir dos nossos resultados de reatividade vascular, podemos sugerir que a abstinência ao etanol seja capaz de promover alterações em um mecanismo celular presente no músculo liso vascular que envolva influxo de cálcio, o qual modula de forma indireta as alterações na contração e no relaxamento anteriormente descritas.

CONCLUSÃO

A partir dos resultados observados neste trabalho, podemos concluir que a abstinência ao etanol induz alterações comportamentais com efeito ansiogênico, estimula o sistema renina-angiotensina-aldosterona sistêmico, promovendo aumento dos níveis plasmáticos de ANG II, hipertensão arterial, estresse oxidativo sistêmico e tecidual, hiporeatividade vascular independente de endotélio e alterações comportamentais.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

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

Abdel-rahman, AR; Dar, MS; Wooles, WR. Effect of chronic ethanol administration on arterial baroreceptor function and pressor and depressor responsiveness in rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 232, p. 194-201, 1985.

Adinoff, B; Risher-Flowers, D; De Jong, J; Ravitz, B; Bone, GH; Nutt, DJ; Roehrich, L; Martin, PR; Linnoila, M. Disturbances of hypothalamic-pituitary-adrenal axis functioning during ethanol withdrawal in six men. **Am J Psychiatry**, v. 8, p. 1023-1025, 1991.

Adinoff, B; Iranmanesh, A; Veldhuis, J; Fisher, L. Disturbances of the stress response: the role of the HPA axis during alcohol withdrawal and abstinence. **Alcohol Health Res World**, v. 22, p. 67-72, 1998.

Akana, SF; Dallman, MF. Chronic cold in adrenalectomized, corticosterone (B)-treated rats: facilitated corticotropin responses to acute stress emerge as B increases. **Endocrinology**, v. 138, p. 3249-3258, 1997.

Altura, BM; Zou, LY; Altura, BT. Beneficial vs. detrimental effects of ethanol on heart coronary vascular muscle: role of Mg²⁺ and Ca²⁺. **Alcohol**, v. 13, p. 499-513, 1996.

Alves, H; Kessler, F; Ratto, LRC. Comorbidade: Uso de álcool e outros transtornos psiquiátricos. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 26, p. S51-S53, 2004.

Araujo, C; Bendhack, LM. Calcium and anococcygeus smooth muscle contraction. **Current Topics In Pharmacology**, v. 7, p. 143-53, 2003.

Balcells, E; Meng, QC; Johnson WH; Cparil, S; Dell'I Italia, LJ. Angiotensin II formation from ACE and chymase in human and animal hearts: methods and species considerations. **Am. J. Physiol.** V. 273, p. H1769-1774, 1997

Balster, RL; Wiley, JL; Tokarz, ME. Effects of ethanol and NMDA antagonists on operant behavior in ethanol withdrawal seizure-prone and resistant mice. **Behavioral Pharmacology**, v. 4, p. 107-113, 1993.

Bannan, LT; Potter, JF; Beevers, DG; Saunders, JB; Walters, JR; Ingram, MC. Effect of alcohol withdrawal on blood pressure, plasma renin activity, aldosterone, cortisol and dopamine beta-hydroxylase. **Clin Sci**, v. 66, p. 659-663, 1984.

Bayard, M; McIntyre, J; Hill, KR; Woodside, JJr. Alcohol withdrawal syndrome. **Am. Fam. Phys.**, v. 69, p. 1443-1450, 2004.

Becker, HC. Animals models of withdrawal. **Alcohol Res. Health**, v. 24, p. 105-113, 2000.

Beckman, H; Frank, RR; Robertson, RD; Brady, KA; Coin, EJ. Evaluation of blood pressure during early alcohol withdrawal. **Ann Emerg. Med.**, v. 10, p. 32-35, 1981.

Beckman, JS; Koppenol, WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. **Am. J. Physiol.**, v. 271, p. 1424-1437, 1996.

Benzie, IF. Lipid peroxidation: a review of causes consequences, measurements and dietary influences. **Int. J. Food Sci. Nut.**, v. 472, p. 33-261, 1996.

Bernardy, NC; King, AC; Lovallo, WR. Cardiovascular responses to physical and psychological stress in female alcoholics with transitory hypertension after early abstinence. **Alcohol Clin. Exp. Res.**, v. 27, p. 1489-1498, September 2003.

Bezzegh, A; Nyuli, L; Kovács, GL. Alpha-atrial natriuretic peptide, aldosterone secretion and plasma renin activity during ethanol withdrawal: a correlation with the onset of delirium tremens? **Alcohol**, v. 8, p. 333-36, 1991.

Botelho, LM; Block, CG; Khosla, MC; Santos, RA. Plasma angiotensin (1-7) immunoreactivity is increased by salt load, water deprivation, and hemorrhage. **Peptides**, v. 15, p. 723-729, 1994.

Boucher, R; Asselin, J; Genest, J. A new enzyme leading to the direct formation of Angiotensin II. **Circ. Res.**, v. 34, p. 203-209, 1974

Buck, HM; Hueston, CM; Bishop, C; Deak, T. Enhancement of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis but not cytokine responses to stress challenges imposed during withdrawal from acute alcohol exposure in Sprague-Dawley rats. **Psychopharmacology**, v. 218, p. 203-15, 2011.

Cabral, A; Isoardi, N; Salum, C; Macedo, CE; Nobre, MJ; Molina, VA; Brandão, ML. Fear state induced by ethanol withdrawal may be due to the sensitization of the neural substrates of aversion in the dPAG. **Exp. Neurol.**, v. 200, p. 200-208, 2006.

Cadenas, E; Sies, H. Oxidative stress: excited oxygen species and enzyme activity. **Adv. Enzyme Regul.**, v. 23, p. 217-237, 1985.

Camacho M, Rodríguez C, Guadall A, Alcolea S, Orriols M, Escudero Jr, Martínez-González J, Vila L. Hypoxia upregulates PGI-synthase and increases PGI release in human vascular cells exposed to inflammatory stimuli. **Journal of Lipid Research.**, v. 52, p. 720-731, 2011.

Campbell DJ. Circulating and tissue angiotensin systems. **J. Clin. Invest.**, v. 79, p. 1-6, 1987

Carlson, RW; Kumar, NN; Wong-Mckinstry, E; Ayyagari, S; Puri, N; Jackson, FK; Shashikumar, S. Alcohol Withdrawal Syndrome. **Crit Care Clin**, v. 28, p. 549-85, 2012.

Carlson, RW; Kumar, NN; Wong-Mckinstry, E; Ayyagari, S; Puri, N; Jackson, FK; Shashikumar, S. Haemodynamic studies in alcoholics in the withdrawal phase. **Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.**, v. 3, p. 61-63, 1971.

Carvalho, V; Pinsky, I; De Souza e Silva, R; Carlini-Contrim, BAL. Drug and alcohol use and family characteristics: a study among Brazilian high-school students., *Addiction*, v. 90, p. 65-72, 1995.

Castro, M; Figueiredo, F; Moreira, AC. Time-course of hypothalamic CRH and pituitary ACTH contents, and pituitary responsiveness to CRH stimulation after bilateral adrenalectomy. **Horm Metab Res**, v. 27, p. 10-15, 1995.

Cat, AN.; Touyz, RM. A new look at the renin-angiotensin system-Focusing on the vascular system. **Peptides**, v. 32, p. 2141-50, 2011.

Ceccanti, M; Sasso, GF; Nocente, R; Balducci, G; Prastaro, A; Ticchi, C; Bertazzoni, G; Santini, P; Attilia, ML. Hypertension in early alcohol withdrawal in chronic alcoholics. **Alcohol Alcohol**, v. 41, p. 5-10, 2006.

Ceccanti, M; Balducci, G. La sindrome da astinenza da alcol.Basi fisiopatologiche, diagnosi e trattamento. **Mediserve**, v. 57, 1996.

Chabielska, E; Pietraszek, M; Malinowska, B; Buczjo, W. The effect of ethanol on some serotonergic mechanisms in rat blood platelets. *Pol. J. Pharmacol.* , v. 40, p. 241-249, 1988.

Chan, TK; Sutter, MC. Ethanol consupction and blood pressure. **Life Sciences**, v. 33, p. 1965-1973, 1983.

Chan, TK.; Sutter, MC. Ethanol consupction, stress, and hypertension. **Hypertension**, v. 7, p. 519-524, 1985.

Cherry, PD; Furchgott, RF; Zawadski, JV; Jothianandan, D. Role of endothelial cells in relaxation of isolated arteries by bradykinin. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 79, p. 2106-2010, 1982.

Clark, LT.; Friedman, HS. Hypertension associated with alcohol withdrawal: assessment of mechanisms and complications. **Alcohol. Clin. Exp. Res**, v. 9, p. 125-30, 1985.

Callman, MF; Akana, SF; Scribner, KA; Bradbury, MJ; Walker, CD; Strack, AM; Casio, C.S. Stress, feedback and facilitation in the hypothalamus pituitary adrenal axis. **Neuroendocrinol.**, v. 4, p. 517-26, 1992.

Dallman, MF; Jones, MT. Corticosteroid feedback control of ACTH secretion: effect of stress-induced corticosterone secretion on subsequent stress responses in the rat. **Endocrinology**, v. 92, p. 1367-1375, 1973.

De Bold, AJ; Borenstein, HB; Veress, AT; Sonnenberg, H. A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. **Life Sci**, v. 28, p. 89-94, 1981.

De Gasparo, M; Catt, KJ; Inagami, T; Wright, JW; Unger, T. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. **Pharmacol Rev**, v. 52, p. 415-472, 2000.

De Witte, P; Pinto, E; Ansseau, M; Verbanck, P. Alcohol and withdrawal: from animal research to clinical issues. **Neurosci. Biobehav. R.**, v. 27, p. 189-197, 2003.

Di Gennaro, C; Saccani-Jotti, G; Pinelli, S; Venturi, N; Palombi, F; Manfredi, G; Pellegrino, A; Bicchieri, L; Paolo, S; Montanari, A. Endothelial dysfunction and high cardiovascular risk profile in severe alcoholics improve only partially following a medium-term alcohol withdrawal. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 36, p. 242-250, 2012.

Dietz, JR. Mechanisms of atrial natriuretic peptide secretion from the atrium. **Cardiovasc. Res**, v. 69, p. 8-17, 2005.

Dimitropoulou, C. Angiotensin II relaxes microvessels via the AT(2) receptor and Ca(2+)-activated K(+) (BK(Ca)) channels. **Hypertension**, v. 37, p. 301-307, 2001.

Doring, WK; Herzenstiel, MN; Krampe, H; Jahn, H; Pralle, L; Sieg, S; Wegerle, E; Poser, W; Ehrenreich, H. Persistent Alterations of Vasopressin and N-Terminal Proatrial Natriuretic Peptide Plasma Levels in Long-Term Abstinent Alcoholics. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 27, p. 849-861, 2003.

Dorris, SL; Peebles, S. PGI2 as a Regulator of Inflammatory Diseases. **Stacy L. Dorris and R. Stokes Peebles Jr.**, Mediators of Inflammation, 2012.

Dusse, LS; Vieira, LM; Carvalho, MC. Nitric oxide revision. **Brazilian Journal of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 39, p. 343-350, 2003.

Dzau, VJ; Pratt, RE. Renin angiotensin system: biology, physiology and pharmacology. In: **The heart and cardiovascular system**. New York: Raven Press, p. 1631-1662, 1986.

Eckert, RE; Karsten, AJ; Utz, J; Ziegler, M. Regulation of renal artery smooth muscle tone by alpha1-adrenoceptors: role of voltage-gated calcium channels and intracellular calcium stores. **Urol. Res.**, v. 28, p. 122-127, 2000.

Economidou, D; Cippitelli, A; Stopponi, A; Braconi, S; Clementi, S; Ubaldi, M; Martin-Fardon, R; Weiss, F; Massi, M; Ciccocioppo, R. Activation of brain NOP receptors attenuates acute and protracted alcohol withdrawal symptoms in the rat. **Alcohol Clin Exp Res.**, v. 35, p. 747-755, 2011.

Edwards, GG; Guthrie, SA. Alcohol dependence: provisional description of a clinical syndrome. **Br. Med. J.**, v. 1, p. 1058-1061, 1976.

Elliott, EJ.; Bower, C. Alcohol and pregnancy: the pivotal role of the obstetrician.. **Aust. N. Z. J. Obstet Gynaecol**, v. 48, p. 236-239, 2008.

Ferrario, CM; Santos, RA; Brosnihan, KB; Block, CH; Schiavone, MT; Khosla, MC; Greene, LJ. A hypothesis regarding the function of angiotensin peptides in the brain. **Clin. Exp. Hypertens**, v. 10 Suppl 1, p. 107-121, 1988.

File, SE. Chronic exposure to noise modifies the anxiogenic response, but not the hypoactivity, detected on withdrawal from chronic ethanol treatment. **Psychopharmacology**, v. 3, p. 369-372, 1994.

Filho, RF; Zilberstein, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 46, p. 265-271, 2000.

Forstermann, U; Hertting, G; Neufang, B. The role of endothelial and non-endothelial prostaglandins in relaxation of isolated blood vessels of the rabbit induced by acetylcholine and bradykinin. **Br. J. Pharmacol.**, v. 87, p. 521-532, 1986.

Fostermann, U; Kleiner, H. Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms. **Arch Pharmacol**, v. 351, p. 351-364, 1995.

Friedman, HJ. Assessment of physical dependence on and withdrawal from ethanol in animals. In: RIGTER, H.; CRABBE, J. C. **Alcohol tolerance and dependence**. New York: Elsevier, 1980. p. 93-121.

Fuchs, FD; Chambless, LE; Whelton, PK; Nieto, FJ; Heiss, G. Alcohol consumption and the incidence of hypertension. the atherosclerosis risk in communities study. **Hypertension**, v. 37, p. 1242-1250, 2001.

Furchgott, RF. Endothelium-derived relaxing factor: discovery, early studies, and identification as nitric oxide. **Biosci. Rep.**, v. 19, p. 235-251, August 1999.

Fyhrquist F, Saijorunaa O. Renin-angiotensin system revisited. **J Intern Med**, v. 264, p.224-236, 2008.

Gigliotti, A; Bessa, MA. Síndrome de Dependência do Álcool: critérios diagnósticos. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 26, p. 11-13, 2004.

Goodfriend, TL.; Elliott, ME.; Catt, KJ. Angiotensin receptors and their antagonists.. **N Engl J Med**, v. 334, p. 1649-1654, 1996.

Griendling, KK.; Sorescu, D; Ushio-Fukai, M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. **Circ Res**, v. 86, p. 494-501, 2000.

Gutkowska, J; Thibault, G; Januszewicz, P; Cantin, M; Genest, J. Direct radioimmunoassay of atrial natriuretic factor. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 31, p. 593-601, 1984.

Haanwinckel, MA; Elias, LK; Favaretto, AL; Gutkowska, J; McCann, SM; Antunes-Rodrigues, J. Oxytocin mediates atrial natriuretic peptide release and natriuresis after volume expansion in the rat. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 92, p. 7902-7906, 1995.

Haanwinckel, MA.; Antunes-Rodrigues, J.; De Castro e Silva, E. Role of central beta-adrenoceptors on stress-induced prolactin release in rats. **Horm Metab Res**, v. 23, p. 318-320, 1991.

Halliwell, B. Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular disease: how should we move forward? **Cardiovasc res**, v. 3, p. 410-418, 2000.

Hernandez-Hernandez, R; Armas-Padilha, MC; Armas-Hernandez, MJ; Velasco, M. The prevalence of hypertension and the state of cardiovascular health in Venezuela and surrounding nations. **Ethn. Dis.**, v. 4, p. 398-405, 1998.

Horiuchi, M; Akishita, M; Dzau, VJ. Recent progress in angiotensin II type 2 receptor research in the rat. **Hypertension**, v. 33, p. 613-621, 1999.

Husain, K; Mejia, J; Lalla, J; Kazim, S. Time response of alcohol-induced alterations in BP, nitric oxide and antioxidants in rat plasma. **Pharmacol Res.**, v. 51, p. 337-343, 2005.

Husain, K; Valquez, M; Ansari, RA; Malafa, MP; Lalla, J. Chronic alcohol-induced oxidative endothelial injury relates Chronic alcohol-induced oxidative endothelial injury relates. **Mol Cell Biochem**, v. 307, p. 51-58, 2008.

Husain, K; Vasquez-Ortiz, M; Lalla, J. Down regulation of aortic nitric oxide and antioxidant systems in chronic alcohol-induced hypertension in rats. **Hum. Exp. Toxicol.**, v. 26, p. 427-434, 2007.

Ibsen, H. Effects of high alcohol intake on blood pressure, adrenergic activity, and the renin-angiotensin system. **J. Clin. Lab. Inv**, v. 176, p. 87-91, 1985.

Ignarro, LJ; Byrns, RE; Buga, GM; Madeira, KS. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. **Circ Res.**, v. 61, p. 866-879, 1987.

Iranmanesh, A; Veldhuis, JD; Johnson, ML; Elizarralde, G. 24-hour pulsatile and circadian patterns of cortisol secretion in alcoholic men. **Journal of Andrology**, v. 10, p. 54-63, 1989.

Israel, A; Cierco, M; Sosa, B. Angiotensin AT(2) receptors mediate vasodepressor response to footshock in rats. Role of kinins, nitric oxide and prostaglandins. **Eur. J. Pharmacol**, v. 394, p. 103-108, 2000.

Izbéki, F; Wittmann, T; Csáti, S; Jeszenszky, E; Lonovics, J. Opposite effects of acute and chronic administration of alcohol on gastric emptying and small bowel transit in rat. *Alcohol Alcohol.*, v. 36, p. 304-308, 2001.

Janero, DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. **Free Radical Biol. Med.**, v. 9, p. 515-540, 1990.

Jankowski, M; Hajjar, F; Kawas, SA; Mukaddam-Daher, S; Hoffman, G; McCann, SM. Rat heart: a site of oxytocin production and action. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, p. 14558-14563, 1998.

Jung, ME; Rewal, M; Perez, E; Wen, Y; Simpkins, JW. Estrogen protects against brain lipid peroxidation in ethanol-withdrawn rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 79, p. 573-586, 2004.

Jung, ME; Simpkins, JW; Wilson, AM; Downey, HF; Mallet, RT. Intermittent hypoxia conditioning prevents behavioral deficit and brain oxidative stress in ethanol-withdrawn rats. **J. Appl. Physiol.**, v. 105, p. 510-517, 2008.

Kahkonen, S; Zvartau, E; Lipsanen, J; Bondarenko, B. Effects of alcohol withdrawal on cardiovascular system. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 35, p. 550-553, 2011.

Kahkonen, S; Bondarenko, BB. L-type Ca²⁺ channels mediate cardiovascular symptoms of alcohol withdrawal in humans.. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 28, p. 45-48, 2004.

Kahonen, M; Karjala, K; Hutri-Kahonen, N; Wu, X; Jaatinen, P; Riihioja, P; Hervonen, A; Porsti, I. influence of chronic ethanol consumption on arterial tone in young and aged rats. **Am. J. Physiol.**, v. 276, p. 464-471, 1999.

Karaki, H; Ozaki, H; Hori, M; Mitsui-Saito, M; Amano, K; Harada, H. Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. **Pharmacol Rev**, v. 49, p. 157-230, 1997.

Khayat, A; Gonda, S; Sen, S; Smeby, RR. Responses of juxtaglomerular cell suspensions to various stimuli. **Hypertension**, v. 2, p. 157-167, 1981.

King, AC; Parsons, OA; Bernardy, NC; Lovallo, WR. Drinking history is related to persistent blood pressure dysregulation in postwithdrawal alcoholics. **Alcohol Clin. Exp. Res.**, v. 18, p. 1172-1176, 1994.

Klatsky, AL; Friedman, GD; Siegeland, AB; Gerard, MJ. Alcohol consumption and blood pressure. **N. Engl. J. Med.**, v. 296, p. 1194-1200, 1977.

Kliethermes, CL. Anxiety-like behaviors following chronic ethanol exposure. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 28, p. 837-850, 2005.

Koob, GF; Britton, KT. Neurobiological substrates for the anti-anxiety effects of ethanol. In: Begleiter, H; Kissin, B. **The pharmacology of alcohol and alcohol dependence**. New York: Oxford University Press., 1996. p. 477-506.

Kuriyama, H.; Kitamura, K; Nabata, H. Pharmacological and physiological significance of ion channels and factors that modulate them in vascular tissues. **Pharmacol Rev**, v. 3, p. 387-573, 1995.

Laranjeira, R; Hasdahd, HH. Consenso sobre a Síndrome de Abstinência do Álcool (SAA) e os seu tratamento. **Rev. Bras. Psiquiatria**, v. 22, p. 62-71, 2000.

Lee, MA; Bohm, M; Paul, M; Ganten, D. Tissue renin-angiotensin systems. Their role in cardiovascular disease. **Circulation**, v. 87, p. IV7-13, 1993.

Lefèvre, G; Beljean-Leymarie, M; Beyerle, F; Bonnefont-Rousselot, D; Cristol, JP; Thérond, P; Torreilles, J. Evaluation of lipid peroxidation by measuring thiobarbituric acid reactive substances. **Ann Biol Clin**, v. 56, p. 305-319, 1998.

Lian, C. L'alcoholisme, cause d' hypertension arterielle. **Bull Acad Natl Med**, v. 74, p. 525-528, 1915.

Loureiro-Silva, MR; Molina, HM; Borges, DR. Substâncias vasoativas e a modulação do sistema microvascular hepático. **Rev Ass Med Brasil**, v. 45, p. 206-216, 1999.

Maciel, C; Florence, KC. Complicações psiquiátricas do uso crônico do álcool: Síndrome de Abstinência e outras síndromes psiquiátricas. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 26, p. 47-50, 2004.

MacMahon, S. Alcohol consumption and hypertension. **Hypertension**, v. 9, p. 111-121, 1987.

MacMahon, SW; Blacket, RB; Macdonald, GJ; Hall, W. Obesity, alcohol consumption and blood pressure in Australian men and women. **J. Hypertens**, v. 2, p. 85-91, 1984.

Mander, AJ; Young, A; MacDonald, TM; Williams, BC; Waugh, CJ; Edwards, CR. Blood pressure, renin-angiotensin-aldosterone axis and cortisol changes during withdrawal from alcohol. **Alcohol Alcohol**, v. 24, p. 409-414, 1989.

Mander, AJ; Jovens, A; Merrick, MV; Morton, JJ. Fluid balance, vasopressin and withdrawal symptoms during detoxification from alcohol. **Drug Alcohol Depend**, v. 3, p. 233-237, 1989.

Marchesi, C; Chiodera, P; Brusamonti, E; Volpi, R; Coiro, V. Abnormal plasma oxytocin and p-endorphin levels in alcoholics after short and long term abstinence. **Prog. Neuro-Psychopharmacol. & Biol. Psychiat.**, v. 21, p. 797-807, 1997.

- Masur, J. **O que é o alcoolismo?** São Paulo: Ed. Brasiliense, 1998.
- Mathews, JD. Alcohol use, hypertension and coronary heart disease. **Clin Sci Mol Med Suppl**, v. 3, p. 661s-663s., 1976.
- McDaniel, NL; Chen, XL; Singer, HA; Murphy, RA; Rembold, CM. Nitrovasodilators relax arterial smooth muscle by decreasing $[Ca^{2+}]_i$ and uncoupling stress from myosin phosphorylation. **Am. J. Physiol.**, v. 263, p. C461-467, 1992.
- Menard, J. Anthology of the renin-angiotensin system: a one hundred reference approach to angiotensin II antagonists. **J Hypertens**, v. 11, p. S3-11, 1993.
- Miyoshi, H; Nakaya, Y; Moritoki, H. Nonendothelial-derived nitric oxide activates the ATP-sensitive K^+ channel of vascular smooth muscle cells. **Febs Lett**, v. 345, p. 47-49, 1994.
- Mohite, A; Chillar, A; So, SP; Cervantes, V; Ruan; KH. Novel mechanism of the vascular protector prostacyclin: regulating microRNA expression.. **Biochemistry**, v. 50, p. 1691-1699, 2011.
- Monteiro, MG. Comorbidade entre dependência de álcool e depressão: Uma visão geral. **Informação Psiquiátrica**, v. 4, p. 143-145, 2004.
- Montezano, AC.; Touyz, RM. Reactive oxygen species and endothelial function - role of NOS uncoupling and Nox family NADPH oxidases. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.**, v. 110, p. 87-94, 2012.
- Moura, EC; Malta, DC; Neto, OLM; Penna, GO; Temporão, JG. Direção de veículos motorizados após consumo abusivo de bebidas alcoólicas, Brasil, 2006 a 2009. **Rev Saúde Pública**, v. 43, p. 891-894, 2009.
- Murad, FJ. The nitric oxide-cyclic GMP signal transduction system for intracellular and intercellular communication. **Recent Prog. Horm. Res.**, v. 49, p. 230-248, 1994.
- Murad, FJ. Cyclic guanosine monophosphate as mediator of vasodilatation. **Clin. Invest.**, v. 78, p. 1-5, 1996.
- Myrick, H; Anton, RF. Treatment of alcohol withdrawal. **Alcohol Health Res World.**, v. 22, p. 38-43, 1998.
- Nelson, MT.; Quayle, JM. Physiological roles and properties of K^+ channels in arterial smooth muscle. **Am. J. Physiol.**, v. 268, p. C799-822, 1995.
- Nguyen, D; Cat, A.; Touyz, RM. Cell signaling of angiotensin II on vascular tone: novel mechanisms. **Curr. Hypertens. Rep.**, v. 13, p. 122-128, 2011.

Nieminem, MM; Fyhrquist, F; Linkola, J; Tikkanen, I; Tontti, K. Renin-aldosterone axis in ethanol intoxication. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 15, p. 879-882, 1981.

Oliver, JA; Sciacca, RR. Local generation of angiotensin II as a mechanism of regulation peripheral vascular tone in the rat. **J. Clin. Invest.**, v. 74, p. 1247-1251, 1984.

Padovan, CM; Batistela, MR; Quieroz, RH; Tirapelli, CR. A role for NO in the anxiogenic effect induced by abstinence to chronic ethanol consumption. **Journal of Psychopharmacology**, v. 24, p. A29, 2010.

Paravicini, TM.; Touyz, RM. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. **Diabetes Care**, v. 31, p. S170-S180, 2008.

Paul, M; Wagner, J; Dzau, VJ. Gene expression of the renin-angiotensin system in human tissues. Quantitative analysis by the polymerase chain reaction. **J. Clin. Invest.**, v. 91, p. 2058-2064, 1993.

Pellow, S; Chopin, P; File, SE; Briley, M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J Neurosci Methods**, v. 14, p. 149-167, 1985.

Peng, FC; Tang, SH; Huang, MC; Chen, CC; Kuo, TL; Yin, SJ. Oxidative Status in Patients with Alcohol Dependence: A Clinical Study in Taiwan. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 68, p. 1497-1509, 2005.

Phillips, MI; Speakman, EA; Kimura, B. Levels of angiotensin and molecular biology of the tissue renin angiotensin systems. **Regul. Pept.**, v. 14, p. 1-20, 1993.

Pinardi, G; Brieva, ; Vinet, R; Penna, ML. Effects of chronic ethanol consumption on α -adrenergic-induced contractions in rat thoracic aorta. **Gen. Pharmacol.**, v. 23, p. 245-248, 1992.

Pokk, P; Sepp, E; Vassiljev, V; Väli, M. The effects of nitric oxide synthase inhibitor 7-Nitroindazole in the behaviour of mice after chronic ethanol administration. **Alcohol & Alcoholism**, v. 36, p. 193-198, 2001.

Polikandriotis, JA; Rupnow, HL; Elms, SC; Clempus, RE; Champbel, DJ; Stliff, RL; Brown, LA; Guidot, DM; Hart, CM. Chronic ethanol ingestion increases superoxide production and NADPH oxidase expression in the lung. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, v. 34, p. 314-319, 2006.

Pollock, DM; Banks, RO. Effect of atrial extract on renal function in the rat. **Clin. Sci**, v. 65, p. 47-55, 1983.

Potter, JF; Bannan, LT; Saunders, JB; Ingram, MC; Beevers, DG. Blood pressure and pressor mechanisms during alcohol withdrawal. **J Hypertens Suppl.**, v. 1, p. 97-99, 1983.

Raizada, V; Skipper, B; Luo, W; Griffith, J. Intracardiac and intrarenal renin-angiotensin systems: mechanisms of cardiovascular and renal effects. **J Investig med**, v. 7, p. 341-359, 2007.

Rajagopalan, S; Kurz, S; Munzel, T; Tarpey, M; Freeman, BA; Griendling, KK; Harrison, D G. Angiotensin II mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NAD/NAPH oxidase activation: contribution to alterations of vasomotor tone. **J Clin Invest**, v. 97, p. 1916-1923, 1996.

Randin, D; Vollenweider, P; Tappy, L. Suppression of alcohol-induced hypertension by dexamethasone. **Journal of Medicine**, v. 332, p. 1733-1737, 1995.

Risher-Flowers, D; Adinoff, B; Ravitz, B; Bone, GH; Martin, PR; Nutt, D; Linnoila, M. Circadian rhythms of cortisol during alcohol withdrawal. **Adv Alcohol Subst Abuse.**, v. 7, p. 37-41, 1988.

Robertson, GL; Mahr, EA; Athar, S; Sinha, T. Development and clinical application of a new method for the radioimmunoassay of arginine vasopressin in human plasma. **J Clin Invest.**, v. 52, p. 2340-2352, 1973.

Rodrigues, CI.; Almeida, FA. Valor e limitações das dosagens de renina plasmática na prática clínica. **Rev Bras Hipertens**, v. 9, p. 203-205, 2002.

Ruginsk, SG; da Silva, AL; Ventura, RR; Elias, LLK; Antunes-Rodrigues, J. Central actions of glucocorticoids in the control of body fluid homeostasis: Review. **Braz J Med Biol Res**, v. 42, p. 61-67, 2009.

Sanchis, C; Aragón, CM. What we drink when drink? The role of the acetaldehyde in the alcohol consumption. **Adicciones**, v. 19, p. 5-11, 2007.

Sanjuliani, AF; Torres, MR SC; Paula, LN; Bassan, FB. Eixo renina-angiotensina-aldosterona: Bases fisiológicas e fisiopatológicas. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, v. 10, p. 20-30, 2011.

Saunders, JB.; Bevers, BC.; Paton, A. Alcohol induced hypertension. **Lancet**, v. 2, p. 653-656, 1981.

Schlorff, EC; Husain, K; Somani, SM. Dose- and time-dependent effects of ethanol on plasma antioxidant system in rat. **Alcohol**, v. 17, p. 97-105, 1999.

Schuckit, MA. Alcohol-use disorders. **Lancet**, v. 373, p. 492-501, 2009.

Sentandreu, MA; Toldrá, F. A fluorescence-based protocol for quantifying angiotensin-converting enzyme activity. **Nat Protoc.** v. 1, p. 2423-2427, 2006.

Sesso, HD; Cook, NR; Buring, JE; Manson, JE; Gaziano, J. M. Alcohol consumption and the risk of hypertension in women and men. **Hypertension**, v. 51, p. 1080-1087, 2008.

Shapiro, RA; Nussler, AK; Di, SM; Wang, SC; Nakayama, DK; Simmons, RL; Snyder, SH; Billiar, TR. Molecular cloning and expression of inducible nitric oxide synthase from human hepatocytes. **Proc Natl Acad Sci**, v. 90, p. 3491-3495, 1993.

Sklaros, 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 J Cardiol.**, v. 53, p. 26-32, 2012.

Soardo, G; Donnini, D; Varutti, R; Milocco, C; Soldano, F; Sechi, LA. Effects of alcohol withdrawal on blood pressure in hypertensive heavy drinkers. **Journal of Hypertension**, v. 24, p. 1493-1498, 2006.

Soares, TJ; Coimbra, TM; Martins, AR; Pereira, AG; Carnio, EC; Branco, LG. Atrial natriuretic peptide and oxytocin induce natriuresis by release of cGMP. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, p. 278-283, 1999.

SOMLYO, AP.; SOMLYO, AV. Signal transduction and regulation in smooth muscle. **Nature**, v. 17, p. 231-236, 1994.

Stanke-Labesque, F; Mallaret, M; Lefebvre, B; Hardy, G; Caron, F; Bessard, G. 2-Arachidonolyl glycerol induces contraction of isolated rat aorta: role of cyclooxygenase-derived products. **Cardiovasc. Res.**, v. 63, p. 155-160, 2004.

Steiner, AA.; Branco, LG. Hypoxia-induced anapnoea: implications and putative mediators. **Daiane Rev Physiol**, v. 64, p. 263-288, 2002.

Strickland, JA.; Wooles, WR. Effect of acute chronic ethanol on the agonist responses of vascular smooth muscle. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 152, p. 83-91, 1988.

Stuerh, DJ; Cho, HJ; Kwon, NS; Weise, MF; Nathan, CF. Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. **Proc Natl Acad Sci**, v. 88, p. 7773-7777, 1991.

Sun, H; Mayhan, WG. Temporal effect of alcohol consumption on reactivity of pial arterioles: role of oxygen radicals. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 280, p. H992-1001, 2001.

Swales, JD.; Samani, NJ. Vascular RAA system. **J. Hum. Hypertens.**, v. 7, p. S3-S6, 1993.

Takai, S; Sakaguchi, M; Jin, D; Yamada, M; Kirimura, K; Miyazaki, M. Different angiotensin II-forming pathways in human and rat vascular tissues. **Clin. Chim. Acta.** V. 305, p. 191-195, 2001.

Takai, S; Jin, D; Muramatsu, M; Miyazaki, M. Chymase as a novel target for the prevention of vascular diseases. **Trends Pharmacol Sci**, v. 25, p. 518-522, 2004.

Teng, B; Murthy, KS; Kuemmerle, JF; Grider, JR; Sase, K; Michel, T; Makhlouf, GM. Expression of endothelial nitric oxide synthase in human and rabbit gastrointestinal smooth muscle cells. **Am J Physiol**, v. 275, p. G342-351, 1998.

Tirapelli, CR; Al-Khoury, J; Bkaily, G; D'Orleans-Juste, P; Lanchote, VL; Uyemura, SA; De Oliveira, AM. Chronic ethanol consumption enhances phenylephrine-induced contraction in the isolated rat aorta. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 316, p. 233-241, 2006a.

Tirapelli, CR; Leone, AFC; Coelho, EB; Resstel, LBM; Corrêa, FMA; Lanchote, VL; Uyemura, SA; Padovan, CM; de Oliveira, AM. Effect of ethanol consumption on blood pressure and rat mesenteric arterial bed, aorta and carotid responsiveness. **J. Pharmacy and Pharmacology**, v. 59, p. 985-993, 2007.

Tirapelli, CR; Leone, AF; Yogi, A; Tostes, RC; Lanchote, VL; Uyemura, SA; Resstel, LB; Corrêa, FM; Padovan, CM; De Oliveira, AM; Coelho, EB. Ethanol consumption increases blood pressure and alters the responsiveness of the mesenteric vasculature in rats. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 60, p. 331-341, 2008.

Tonnesen, MG; Klempner, MS; Austen, KF; Wintroub, BU. Identification of a human neutrophil angiotensin II-generating protease as cathepsin G. **J. Clin. Invest.** v. 69, p. 25-30, 1982.

Torretti, J. Sympathetic control of renin release. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 22, p. 167-192, 1982.

Touyz, R. M.; Berry, C. Recent advances in angiotensin II signaling. **Braz J Med Biol Res**, v. 35, p. 1001-1015, 2002.

Touyz, R. M.; Schiffrin, E. L. Signal Transduction Mechanisms Mediating the Physiological and Pathophysiological Actions of Angiotensin II in Vascular Smooth Muscle Cells. **Pharmacol Rev**, v. 52, p. 639-672, 2000.

Trevisan, I; Boutros, N; Petrakis, I; Krystal, J. Complications of alcohol withdrawal: pathophysiological insights. **Alcohol Health Res. World**, v. 22, p. 61-66, 1998.

Urata, H; Kinoshita, A; Misono, KS; Bumpus, FM; Husain, A. Identification of a highly specific chymases as the major angiotensin II-forming enzyme in the human heart. **J. Biol. Chem.** V. 265, p. 22348-22357, 1990b.

Urso, T; Gavalier, JS; Van Thiel, DH. Blood ethanol levels in sober alcohol users seen in an emergency room. *Life Sciences*, v. 28, p. 1053-1056, 1981.

Van De Kar, LD; Blair, ML. Forebrain pathways mediating stress-induced hormone secretion. *Front Neuroendocrinol*, v. 20, p. 1-48, 1999.

Vane, JR; Anggard, EE; Botting, RM. Regulatory functions of the vascular endothelium. *N. Engl. J. Med.*, v. 323, p. 27-36, 1990.

Varlinskaya, EI; Spear, LP. Acute ethanol withdrawal (hangover) and social behavior in adolescent and adult male and female Sprague-Dawley rats. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, v. 28, p. 40-50, 2004.

Vasconcelos, SML; Goulart, MOF; Silva, MAM; Gomes, ACM. Oxidative hypothesis of hypertension: a mini-review. *Rev Bras Hipertens*, v. 14, p. 269-274, 2007.

Viaro, F; Nobre, F; Evora, PB. Expressão das Óxido Nítrico Sintetases na Fisiopatologia das Doenças Cardiovasculares. *Arq Bras Cardiol*, v. 74, p. 365-379, 2000.

Walsh, MP. Calmodulin and the regulation of smooth muscle contraction. *Mol Cell Biochem*, v. 135, p. 21-41, 1994.

Warnholtz, A; Nickenig, G; Schulz, E. Increased NADH-oxidase-mediated superoxide production in the early stages of atherosclerosis: evidence for involvement of the rennin-angiotensin system. *Circulation*, v. 99, p. 2027-2033, 1999.

Werstiuk, ES; Lee, RM. Vascular beta-adrenoceptor function in hypertension and in ageing. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, v. 78, p. 433-452, 2000.

Yogi, A; Callera, GE; Mecawi, AS; Batalhão, ME; Carnio, EC; Antunes-Rodrigues, J; Queiroz, RH; Touyz, RM; Tirapelli, CR. Acute ethanol intake induces superoxide anion generation and mitogen-activated protein kinase phosphorylation in rat aorta: A role for angiotensin type 1 receptor. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 264, p. 470-478, 2012.

Yoshita, K; Miura, K; Morikawa, Y; Ishizaki, M; Kido, T; Naruse, Y; Soyama, Y; Suwazono, Y; Nogawa, K; Nakagawa, H. Relationship of alcohol consumption to 7-year blood pressure change in Japanese men. *J Hypertens*, v. 8, p. 1485-1490, 2005.

Yuksel, N; Uzbay, IT; Karakiliç, H; Aki, OE; Etik, C; Erbas, D. Increased serum nitrite/nitrate (NOx) and malondialdehyde (MDA) levels during alcohol withdrawal in alcoholic patients. *Pharmacopsychiatry*, v. 38, p. 95-96, 2005.

Zafari, AM; Ushio-Fukai, M; Akers, M; Yin, Q; Shah, A; Harrison, DG; Taylor, WR; Griending, KK. Role of NADH/NADPH oxidase-derived H₂O₂ in angiotensin II-induced vascular hypertrophy. **Hypertension**, v. 3, p. 488-495, 1998.

Zhang, Z; Morse, AC; Koob, GF; Schuteis, G. Dose- and time-dependent expression of anxiety-like behavior in the elevated plus-maze during withdrawal from acute and repeated intermittent ethanol intoxication in rats. **Alcoholism: Clin. Exp. Res.**, v. 31, p. 1811-1819, 2007.

Zhao, Y; Weiss, F; Zorrilla, EP. Remission and resurgence of anxiety-like behavior across protracted withdrawal stages in ethanol-dependent rats. **Alcohol Clin Exp Res.**, v. 31, p. 1505-1515, 2007.

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

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 11.1.1212.53.5), intitulado "Consequências Celulares e Funcionais da Síndrome de Abstinência ao Etanol sobre a Função Vascular", de autoria de **Natália de Almeida Gonzaga**, e de **Carlos Renato Tirapelli** por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do Campus de Ribeirão Preto – USP foi aprovado em reunião da CEUA de 06/10/2011.

Colaborador: Claudia Maria Padovan

This is to certify that the work (Protocol number 11.1.1212.53.5), entitled: "Consequências Celulares e Funcionais da Síndrome de Abstinência ao Etanol sobre a Função Vascular", by **Natália de Almeida Gonzaga** and **Carlos Renato Tirapelli**, is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the Campus of Ribeirão Preto – USP, and was approved in the meeting, October 06, 2011.

Ribeirão Preto, 11 de outubro de 2011.

Presidente da CEUA
Profa.Dra. Christie Ramos Andrade Leite Panissi

Secretária da CEUA
Maria Angélica Depiro