

O Consumo Agudo de Etanol Induz a Ativação da NAD(P)H Oxidase e Translocação da RhoA em Artérias de Resistência

Acute Ethanol Intake Induces NAD(P)H Oxidase Activation and RhoA Translocation in Resistance Arteries

Janaina A. Simplicio,² Ulisses Vilela Hipólito,² Gabriel Tavares do Vale,² Gláucia Elena Callera,³ Camila André Pereira,² Rhian M Touyz,³ Rita de Cássia Tostes,² Carlos R. Tirapelli¹

Departamento de Enfermagem Psiquiátrica e Ciências Humanas - Laboratório de Farmacologia - Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo (USP);¹ Programa de Pós-Graduação em Farmacologia - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo (USP);² SP, Brasil; University of Ottawa³, Canada

Resumo

Fundamento: O mecanismo da disfunção vascular induzido pelo consumo de etanol não é totalmente compreendido. Justifica-se, assim a identificação de mecanismos bioquímicos e moleculares que poderiam explicar tais efeitos.

Objetivos: Investigar se a ingestão aguda de etanol ativa a via vascular RhoA/Rho quinase em artérias de resistência e o papel das espécies reativas de oxigênio (ERO) derivadas da NAD(P)H oxidase nessa resposta. Nós também avaliamos se ocorreu translocação da p47phox e ativação da NAD(P)H oxidase após o consumo agudo de etanol.

Métodos: Ratos Wistar machos foram tratados com etanol via oral (1g/kg, p.o. gavagem) ou água (controle). Alguns ratos foram tratados com vitamina C (250 mg/kg, p.o. gavagem, 5 dias) antes de água ou etanol. O leito arterial mesentérico (LAM) foi coletado 30 min após a administração de etanol.

Resultados: A vitamina C preveniu o aumento da geração de ânion superóxido (O_2^-) e lipoperoxidação no LAM induzidos pelo etanol. A atividade da catalase (CAT), da superóxido dismutase (SOD) e os níveis de glutathione reduzida (GSH), nitrato e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) não foram afetados após a ingestão aguda de etanol. A vitamina C e o 4-metilpirazol preveniram o aumento na geração de O_2^- induzido pelo etanol em cultura de células do músculo liso vascular (CMLV). O etanol não afetou a fosforilação da proteína quinase B (Akt) e nem da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) (nos resíduos de Ser¹¹⁷⁷ ou Thr⁴⁹⁵) ou a reatividade vascular do LAM. A vitamina C preveniu o aumento da razão membrana:citosol da p47phox e a expressão da RhoA no LAM de rato induzido pelo etanol.

Conclusão: A ingestão aguda de etanol induz a ativação da via RhoA/Rho quinase por um mecanismo que envolve a geração de ERO. Nas artérias de resistência, o etanol ativa NAD(P)H oxidase induzindo a translocação da p47phox por um mecanismo redox-sensível. (Arq Bras Cardiol. 2016; 107(5):427-436)

Palavras-chave: Etanol; NADPH Oxidase; Ratos; Estresse Oxidativo; Ácido Ascórbico; Proteína rhoA de Ligação do GTP.

Abstract

Background: The mechanism underlying the vascular dysfunction induced by ethanol is not totally understood. Identification of biochemical/molecular mechanisms that could explain such effects is warranted.

Objective: To investigate whether acute ethanol intake activates the vascular RhoA/Rho kinase pathway in resistance arteries and the role of NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species (ROS) on such response. We also evaluated the requirement of p47phox translocation for ethanol-induced NAD(P)H oxidase activation.

Methods: Male Wistar rats were orally treated with ethanol (1g/kg, p.o. gavage) or water (control). Some rats were treated with vitamin C (250 mg/kg, p.o. gavage, 5 days) before administration of water or ethanol. The mesenteric arterial bed (MAB) was collected 30 min after ethanol administration.

Results: Vitamin C prevented ethanol-induced increase in superoxide anion (O_2^-) generation and lipoperoxidation in the MAB. Catalase and superoxide dismutase activities and the reduced glutathione, nitrate and hydrogen peroxide (H_2O_2) levels were not affected by ethanol. Vitamin C and 4-methylpyrazole prevented the increase on O_2^- generation induced by ethanol in cultured MAB vascular smooth muscle cells. Ethanol had no effect on phosphorylation levels of protein kinase B (Akt) and eNOS (Ser¹¹⁷⁷ or Thr⁴⁹⁵ residues) or MAB vascular reactivity. Vitamin C prevented ethanol-induced increase in the membrane: cytosol fraction ratio of p47phox and RhoA expression in the rat MAB.

Conclusion: Acute ethanol intake induces activation of the RhoA/Rho kinase pathway by a mechanism that involves ROS generation. In resistance arteries, ethanol activates NAD(P)H oxidase by inducing p47phox translocation by a redox-sensitive mechanism. (Arq Bras Cardiol. 2016; 107(5):427-436)

Keywords: Ethanol; NADPH Oxidase; Rats; Oxidative Stress; Ascorbic Acid; rhoAGTP-Binding Protein.

Full texts in English - <http://www.arquivosonline.com.br>

Correspondência: Carlos Renato Tirapelli •

Avenida Bandeirantes 3900, Monte Alegre. CEP 14040 902, Ribeirão Preto, SP - Brasil

E-mail: crtirapelli@eerp.usp.br, crtילו@hotmail.com

Artigo recebido em 29/03/16; revisado em 12/04/16; aceito em 24/05/16.

DOI: 10.5935/abc.20160147

Introdução

O consumo excessivo de etanol, frequentemente referido na literatura como “*binge drinking*”, é considerado um fator de risco para o sistema cardiovascular. *Binge drinking* está associado a um risco aumentado para eventos cardiovasculares, tais como aterosclerose, acidente vascular cerebral e infarto do miocárdio¹⁻³. O mecanismo exato que envolve a disfunção cardiovascular associada com o consumo excessivo de álcool não foi totalmente elucidado, mas alterações da função vascular parecem exercer um papel fundamental⁴⁻⁶.

Um mecanismo importante pelo qual o etanol causa danos vasculares é pelo aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (ERO). A formação de ânion superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) está associada à disfunção vascular.^{7,8} A enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, [NAD(P)H] oxidase, é a principal fonte de ERO nas células endoteliais e nas células do músculo liso vascular (CMLV)⁹, sendo um fator essencial na disfunção vascular induzida por etanol¹⁰. A ativação da [NAD(P)H] oxidase é um processo complexo, mas a translocação da subunidade p47phox para a membrana, com posterior associação com o citocromo b_{558} , é uma etapa decisiva para a ativação da enzima.¹¹ Achados recentes do nosso laboratório mostraram que a ingestão aguda de etanol aumenta a geração de ERO derivados da NADPH oxidase em artérias de resistência.¹²

ERO influenciam na ativação de diversas vias de sinalização, incluindo as proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) e a RhoA/Rho quinase, consideradas importantes mediadores de disfunção vascular. A ativação de vias redox-sensíveis regula o crescimento de células vasculares, a inflamação e a contração¹³. Um dado importante é que a ingestão aguda de etanol induz a ativação da [NAD(P)H] oxidase e a fosforilação de MAPK em artérias de resistência¹². Além disso, o O_2^- é responsável pela rápida inativação do óxido nítrico (NO)¹⁴ e, alterações na síntese e/ou biodisponibilidade do NO estão envolvidas no desenvolvimento de eventos vasculares clinicamente significantes.

No presente estudo, buscamos investigar se a ingestão aguda de etanol ativa a via da RhoA/Rho quinase em células vasculares de artérias de resistência, e o papel das ERO derivadas da [NAD(P)H] oxidase nessa resposta. Além disso, avaliamos a translocação da p47phox para a ativação da [NAD(P)H] oxidase induzida por etanol, e o efeito das ERO induzidas pelo etanol sobre a produção de NO. O ácido ascórbico (vitamina C) foi o antioxidante escolhido, uma vez que, segundo estudos anteriores^{15,16}, reduz o estresse oxidativo na vasculatura.

Métodos

Administração aguda de etanol

Dose de 1g/kg de etanol (10mL/kg de etanol a 13% diluído em água) foi administrado por gavagem a 20 ratos Wistar machos (200-250g) mantidos em jejum por 12 h.^{12,16} Aplicando esse modelo de administração, os níveis sanguíneos

de etanol mantêm-se no intervalo entre 20 e 24 mmol/L^{12,16,17}. Ratos do grupo controle (n=20) receberam água (gavagem). Alguns animais foram tratados com vitamina C na dose de 250 mg/kg (gavagem) por 5 dias,^{16,18,19} antes da administração de água (n=18) ou etanol (n=19). O tamanho da amostra foi baseado em estudos prévios.^{12,16,17} O leito arterial mesentérico (LAM) foi isolado 30 min após a administração de etanol.¹⁷ Todos os experimentos estavam de acordo com os princípios e diretrizes do comitê de ética em uso de animais da Universidade de São Paulo (#10.1.235.53.0).

Detecção de O_2^- no LAM de rato

A produção de O_2^- no LAM de ratos foi medida pelo método da quimioluminescência da lucigenina, conforme descrito anteriormente.¹² A luminescência foi medida em um luminômetro (Orion II Luminometer, Berthold detection systems, Pforzheim, Germany), e os resultados expressos em unidades relativas de luz (URL) por mg de proteína. As concentrações de proteína nas amostras foram medidas pelo método de Lowry (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

Detecção de H_2O_2 no LAM de rato

Para medir a concentração de H_2O_2 no LAM de rato, foi utilizado o Amplex red® (#A22188, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), conforme descrito previamente.²⁰ Os resultados foram expressos em nmol por mg de proteína.

Detecção de nitrato basal no LAM de rato

A concentração basal de nitrato no sobrenadante do homogeneizado de LAM foi avaliado usando um analisador de óxido nítrico Sievers (NOA™ 280, Sievers Instruments, CO, USA), conforme descrito previamente.¹² Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol/L}$ por mg de proteína.

Avaliação das atividades da superóxido dismutase (SOD) e da catalase (CAT) em LAM de rato

A atividade da SOD no LAM de rato foi avaliada usando um kit disponível comercialmente (#19160, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). A atividade da SOD foi expressa como taxa de inibição (%) / mg de proteína. A atividade da CAT foi determinada conforme descrito anteriormente.¹² Uma unidade de CAT foi definida como a quantidade de enzima necessária para decompor 1 μmol de H_2O_2 /min.

Avaliação da concentração de glutathione reduzida (GSH) em LAM de rato

A concentração de GSH no LAM foi determinada conforme descrito anteriormente.¹² Os resultados foram expressos em μg GSH por mg de proteína.

Avaliação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em LAM de rato

A concentração de TBARS no LAM foi determinada utilizando-se um kit disponível comercialmente (#10009055, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA). Os resultados foram expressos em nmol por mg de proteína.

Immunoblotting

O LAM de rato foi homogeneizado em um tampão de lise composto por 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7,4), NP-40 (1%), desoxicolato de sódio (0,5%) e SDS (0,1%). As amostras foram centrifugadas a $5000 \times g$ por 10 min (4°C). Quarenta microgramas de proteína foram separadas por eletroforese em um gel de poliacrilamida a 10%, e transferida para uma membrana de nitrocelulose. Leite desnatado (5%) diluído em solução salina tamponada (Tris) com Tween 20 foi usado para bloquear sítios de ligação não específicos (1 h a 24°C). As membranas foram incubadas por uma noite a 4°C com os seguintes anticorpos primários: p-eNOS (Ser¹⁷⁷) (diluído 1:1000, 9571, Cell Signaling, Danvers, MA, USA), p-eNOS (Thr⁴⁹⁵) (diluído 1:1000, 9574, Cell Signaling), eNOS total (diluído 1:1000, 9572, Cell Signaling), P- proteína quinase B (P-Akt) (Ser⁴⁷³) (diluído 1:1000, 4058, Cell Signaling) e Akt total (diluído 1:1000, 9272, Cell Signaling). Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpos secundários por 90 min à temperatura ambiente e os sinais foram revelados pela exposição das membranas à uma solução de quimioluminescência e quantificados densitometricamente. Os resultados foram expressos pela razão entre proteínas não fosforiladas / proteínas totais.

Fracionamento celular (membrana plasmática / citosol)

O LAM de rato foi homogeneizado em tampão de lise contendo Tris-HCl 50 mmol/L (pH 7,4), EDTA 2,5 mmol/L, EGTA 5 mmol/L, e inibidor de protease. Em seguida, centrifugado a $100\,000 \times g$ por 1 h, a 4°C. O sobrenadante (fração citosólica) foi coletado. O *pellet*, contendo a fração com partículas, foi ressuspenso em tampão de lise contendo Triton X-100 1%, e centrifugado a $10\,000 \times g$ por 10 min a 4°C. As membranas foram então incubadas com anticorpos específicos para RhoA (diluído 1:1000, sc-418, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) ou p47phox (diluído 1:500, Santa Cruz Biotechnology), como publicado anteriormente.²¹

Experimentos de reatividade vascular

Ratos machos Wistar foram anestesiados com uretana (1,25 g/kg, i.p., Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), e sacrificados por exsanguinação da aorta. Segmentos do terceiro ramo das artérias mesentéricas, medindo aproximadamente 2 mm de comprimento, foram colocados em um miógrafo para pequenos vasos (Danish Myo Tech, Model 620M, A/S, Århus, Denmark), conforme descrito previamente.²² As artérias foram mantidas em solução Krebs Henseleit [(em mmol/L) NaCl 130, KCl 4,7, KH₂PO₄ 1,18, MgSO₄ 1,17, NaHCO₃ 14,9, glicose 5,5, EDTA 0,03, CaCl₂ 1,6], temperatura constante de 37°C, pH 7,4, e gaseificadas com uma mistura de O₂ 95% e CO₂ 5%. Curvas dose-resposta à fenilefrina (0,1 nmol/L–100 µmol/L) foram obtidas em artérias com endotélio intacto e na ausência de endotélio. As curvas para acetilcolina (0,1 nmol/L–10 µmol/L) foram obtidas nas artérias com endotélio intacto, pré-contraídas com fenilefrina (1 µmol/L). Curvas dose-resposta foram ajustadas com um programa não linear de ajuste de curvas (Graph Pad Prism 3.0; GraphPad Software Inc., San Diego, CA) e dois parâmetros farmacológicos foram analisados: pD₂ (logaritmo negativo da concentração molar da droga produzindo 50% da resposta máxima) e E_{max} (efeito máximo induzido pelo agonista).

Cultura de células e estimulação

CMLV derivadas do LAM de ratos machos foram isoladas e caracterizadas como descrito anteriormente.²³ Foram utilizadas células nas séries 4 a 8 isoladas de pelo menos 5 culturas diferentes de células primárias. As CMLV foram estimuladas com etanol (50 mmol/L, 5 min) na ausência e na presença de apocinina, um inibidor da NAD(P)H oxidase (10 µmol/L, 30 min), tiron (sequestrador de O₂⁻, 10 µmol/L, 30 min), 4-metilpirazol (4-MP) (10 µmol/L, 30 min), um inibidor seletivo de álcool desidrogenase (ADH,) ou vitamina C (100 µmol/L, 24 h). A concentração e o período de exposição ao etanol e aos antioxidantes foram baseados em estudos prévios.^{12,24} A produção de ânion superóxido foi medida por quimioluminescência dependente de lucigenina como descrito acima, e expressa em porcentagem de aumento dos valores basais.

Análise estatística

Os dados foram representados pela média ± erro padrão da média. A comparação entre os grupos foi realizada por análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de comparação múltipla de Bonferroni. Os dados apresentavam distribuição normal. Os resultados dos testes estatísticos com p<0,05 foram considerados significativos. As análises foram realizadas pelo programa Graph Pad Prism 3.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

Resultados

Níveis de etanol sanguíneo

Conforme descrito previamente,^{12,16,17} neste modelo de administração de etanol, os níveis sanguíneos de etanol variam de 20 a 24 mmol/L, os quais encontram-se dentro dos valores encontrados na corrente sanguínea humana após um episódio de *binge drinking*.²⁵

Efeito da ingestão aguda de etanol sobre os níveis de O₂⁻, H₂O₂, TBARS, nitrato, GSH e atividades da SOD e CAT no LAM de ratos

Para verificar o efeito da ingestão aguda de etanol sobre a geração de ERO e peroxidação lipídica no LAM de rato, foi avaliada a geração de O₂⁻ e H₂O₂, bem como a concentração de TBARS. A quimioluminescência dependente de lucigenina foi significativamente maior no LAM de ratos tratados com etanol, e o tratamento com vitamina C preveniu essa resposta (Figura 1A). Não foram observadas mudanças nos níveis de H₂O₂ após tratamento com etanol (Figura 1B). A vitamina C preveniu o aumento na concentração de TBARS induzido por ingestão aguda de etanol (Figura 1C). Uma vez que o estresse oxidativo está associado com menor biodisponibilidade de NO, nós avaliamos o efeito da ingestão aguda de etanol sobre a concentração de nitrato no LAM de rato. O tratamento com etanol não alterou os níveis basais de nitrato no LAM de rato (Figura 1D). Para avaliar o efeito do etanol sobre o estado antioxidante vascular, foram determinadas as atividades da SOD e CAT, bem como as concentrações de GSH no LAM de rato. Nossos resultados mostraram que a ingestão aguda de etanol não alterou as atividades da SOD e CAT (Figuras 2A e B), ou os níveis de GSH (Figura 2C).

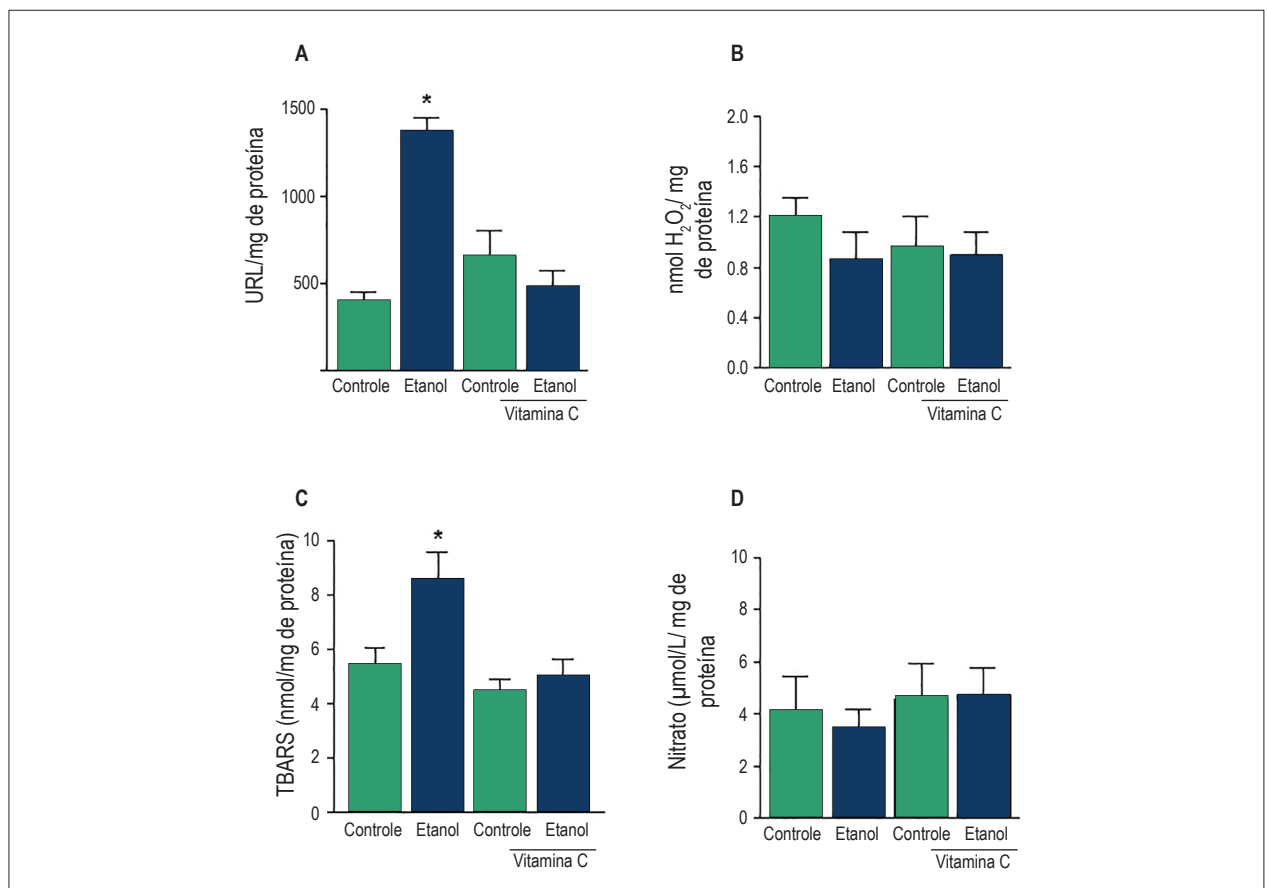


Figura 1 – Efeitos da ingestão aguda de etanol sobre os níveis de O_2 , H_2O_2 e nitrito no leito arterial mesentérico de rato. Os níveis vasculares de O_2 (A) e nitrito (D) foram determinados por quimioluminescência. Os níveis vasculares de H_2O_2 foram determinados por fluorimetria (B). Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram medidas por colorimetria (C). Os resultados foram apresentados em média \pm erro padrão da média de 6-9 experimentos. *Em comparação aos grupos controle, controle + vitamina C e etanol + vitamina C ($p < 0,05$, ANOVA).

Efeito de etanol sobre a geração de O_2 na cultura de CMLV de LAM

O efeito antioxidante da vitamina C foi testado na cultura de CMLV derivadas do LAM. A vitamina C preveniu o aumento da geração de O_2^- induzida por etanol (50 mmol/L, 5 min) em cultura de CMLV. A fim de avaliar o papel de um metabólito de etanol sobre a geração de O_2^- induzida por etanol, as células foram incubadas com 4-MP, um inibidor de ADH. 4-MP preveniu a geração de O_2^- induzida por etanol na cultura de CMLV (Figura 3).

Avaliação de fosforilação de Akt e eNOS no LAM de rato

Nossos resultados mostraram que não houve alteração na fosforilação da Akt no resíduo de Ser⁴⁷³ ou da eNOS nos resíduos de Ser¹¹⁷⁷ e Thr⁴⁹⁵ após ingestão aguda de etanol ou tratamento com vitamina C (Figura 4).

Avaliação da translocação da p47phox e RhoA em LAM de rato

Uma vez que a NAD(P)H oxidase é a principal fonte de ERO na vasculatura, e as ERO proveniente da NAD(P)H induzem a ativação da via de sinalização RhoA/Rho quinase, foi

avaliado o efeito do etanol sobre a translocação da p47phox e RhoA. LAM de ratos tratados com etanol apresentaram um aumento significativo na expressão proteica da razão fração membrana/citosol da p47phox (Figura 5A) e na expressão proteica de RhoA (Figura 5B), indicando a translocação das proteínas. O tratamento com vitamina C preveniu o aumento da translocação da p47phox e da RhoA induzida pelo etanol.

Experimentos sobre a reatividade vascular da artéria mesentérica

O tratamento com etanol não afetou o relaxamento induzido por acetilcolina (E_{max} : $98,3 \pm 1,5\%$; pD_2 : $8,2 \pm 0,2$, $n=6$), quando comparado aos grupos controle (E_{max} : $100,3 \pm 2,3\%$; pD_2 : $8,1 \pm 0,4$, $n=6$), controle + vitamina C (E_{max} : $98,6 \pm 1,8\%$; pD_2 : $8,1 \pm 0,2$, $n=4$) e etanol + vitamina C (E_{max} : $99,8 \pm 0,4\%$; pD_2 : $7,8 \pm 0,3$, $n=5$). Nas artérias com endotélio intacto, a ingestão aguda de etanol não afetou a contração (% KCl 120 mmol/L) induzida por fenilefrina (E_{max} : $138,8 \pm 10,4\%$; pD_2 : $5,9 \pm 0,3$, $n=5$), em comparação aos grupos controle (E_{max} : $136,3 \pm 10,3\%$; pD_2 : $6,3 \pm 0,2$, $n=4$), controle + vitamina C (E_{max} : $112,9 \pm 2,4\%$; pD_2 : $6,3 \pm 0,1$, $n=4$) e etanol + vitamina C (E_{max} : $122,3 \pm 7,7\%$; pD_2 : $6,1 \pm 0,1$, $n=6$). O mesmo foi observado

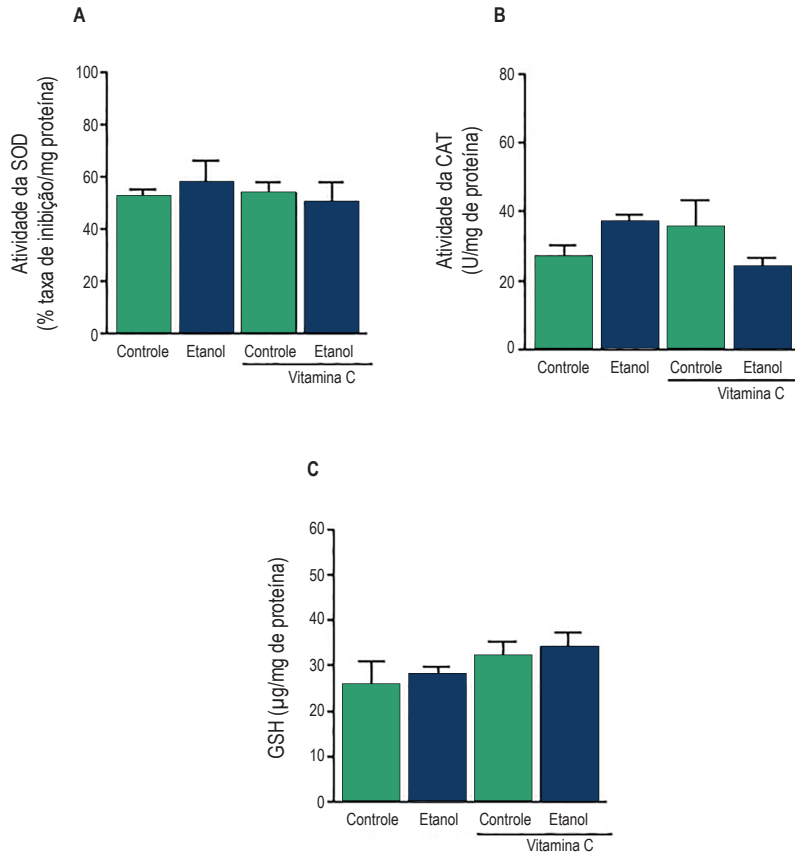


Figura 2 – Efeitos da ingestão aguda de etanol sobre as atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) e os níveis de glutatona reduzida (GSH) no leito arterial mesentérico de rato. As atividades da SOD e CAT (A e B) e os níveis de GSH (C) foram determinados colorimetricamente. Os resultados foram apresentados em média \pm erro padrão da média de 6-8 experimentos.

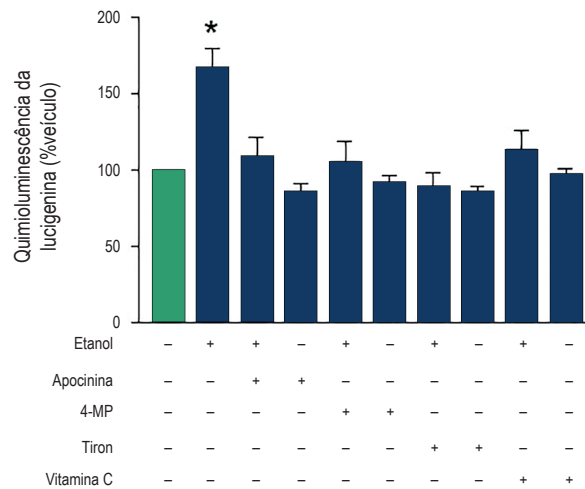


Figura 3 – Efeito do tiron, da apocinina, do 4-metilpirazol (4-MP) e da vitamina C sobre a geração de O_2 induzida por etanol na cultura de células vasculares do músculo liso de células do leito arterial mesentérico de rato. As células foram estimuladas com etanol (50 mmol/L, 5 min) na ausência de inibidor ou após incubação com tiron (10 μ mol/L, 30 min), apocinina (10 μ mol/L, 30 min), 4-MP (10 μ mol/L, 30 min) ou vitamina C (100 μ mol/L, 24 h). As barras representam média \pm erro padrão da média de 7-11 experimentos. *Comparado ao veículo ($p < 0,05$, ANOVA).

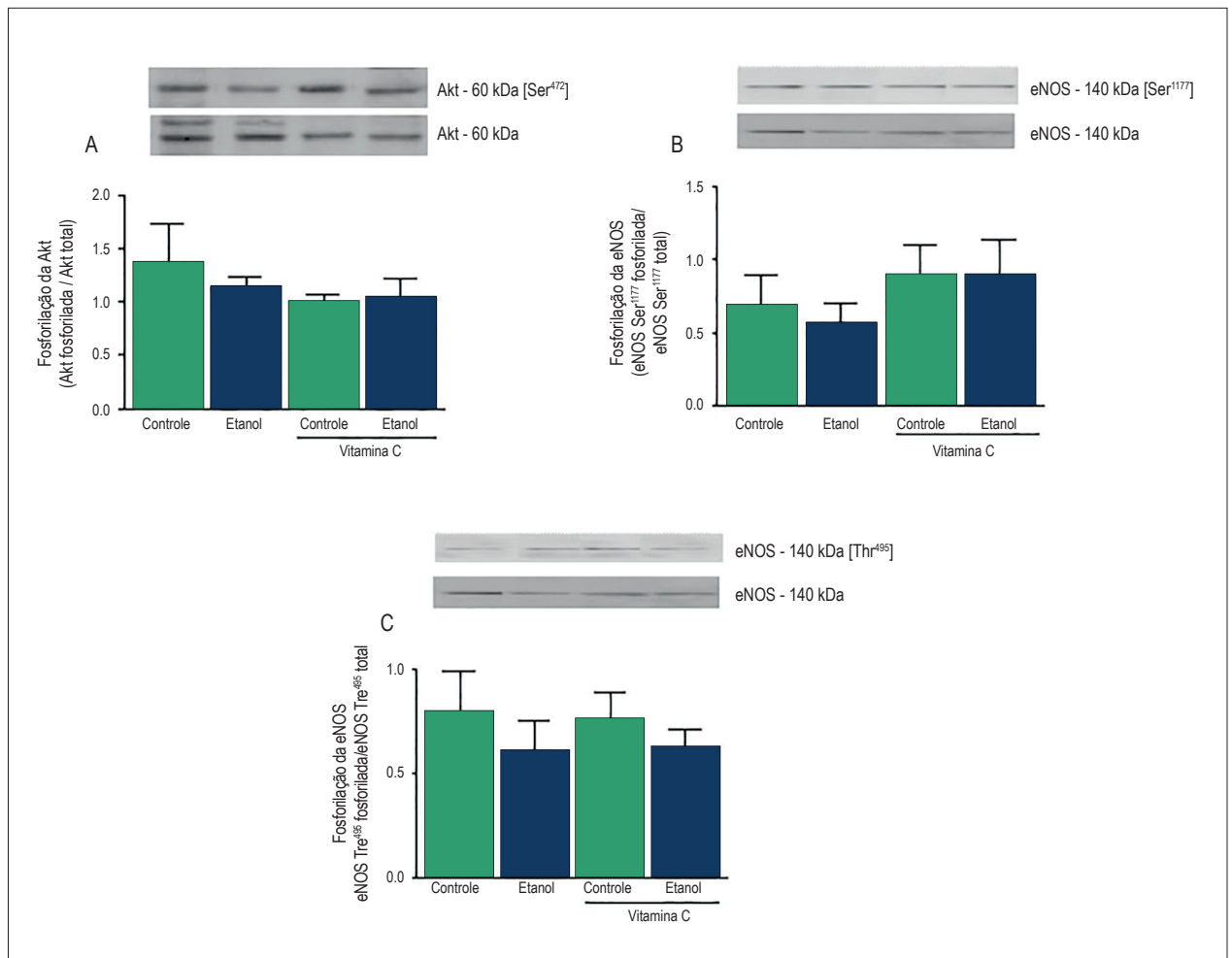


Figura 4 – Efeitos da ingestão aguda de etanol sobre a fosforilação da proteína quinase B (Akt) e óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) no leito arterial mesentérico de rato. Parte superior: resultados de western blotting para expressão e fosforilação de Akt e proteína eNOS. Parte inferior: gráficos de coluna correspondentes mostrando dados densitométricos para fosforilação da Akt no resíduo de Ser⁴⁷³ (A), eNOS no resíduo de Ser¹¹⁷⁷ (B), eNOS no resíduo de Thr⁴⁶⁵ (C). Os resultados foram apresentados em média \pm erro padrão da média de 4-6 experimentos.

nas artérias sem endotélio, em que o tratamento com etanol não afetou a contração induzida por fenilefrina (E_{\max} : $135,1 \pm 7,2\%$; pD_2 : $6,1 \pm 0,1$, $n=6$), em comparação aos grupos controle (E_{\max} : $120,7 \pm 5,5\%$; pD_2 : $6,1 \pm 0,3$, $n=5$), controle + vitamina C (E_{\max} : $116,3 \pm 3,5\%$; pD_2 : $5,7 \pm 0,1$, $n=4$) e etanol+ vitamina C (E_{\max} : $144,3 \pm 10,4\%$; pD_2 : $6,1 \pm 0,3$, $n=5$).

Discussão

Os resultados presentes mostram que a ingestão aguda de etanol induz a translocação da RhoA e a ativação da NAD(P)H oxidase, pela translocação da p47phox em artérias de resistência. Apesar de aumentar a geração de ERO, a ingestão aguda de etanol não afeta a síntese ou a biodisponibilidade de NO nas artérias de resistência. A relevância de nossos achados ganha força ao considerarmos estudos prévios de nosso grupo de pesquisa^{12,16,17} em que se demonstrou que, utilizando este mesmo modelo de administração de etanol, a concentração plasmática de etanol atingida é de 20-24 mmol/L, a qual corresponde à

encontrada em humanos após consumo excessivo de álcool,²⁵ ou em ratos após 30 min de administração oral de etanol.²⁶

Nossos resultados demonstraram que o etanol aumentou a geração de O_2^- no LAM de rato, o que está de acordo com resultados prévios de nosso laboratório.¹²

Além disso, observou-se um aumento da peroxidação lipídica no LAM de rato após ingestão de álcool. O teste de quimioluminescência dependente de lucigenina baseia-se na ação enzimática da enzima NAD(P)H oxidase.²⁷ Nesse sentido, o aumento na quimioluminescência descrito neste estudo sugere que a enzima NAD(P)H oxidase seja uma importante fonte de geração de O_2^- induzida pelo etanol nas artérias de resistência. Esta ideia é corroborada pelo fato de que a apocinina inibiu a geração de O_2^- na cultura de CMLV. A vitamina C é um eficaz agente sequestrador de O_2^- ,²⁸ e, em nosso modelo, ela diminuiu a geração de O_2^- e a peroxidação lipídica em artérias de resistência. A propriedade antioxidante da vitamina C também está associada à menor ativação de NAD(P)H oxidase.¹⁵

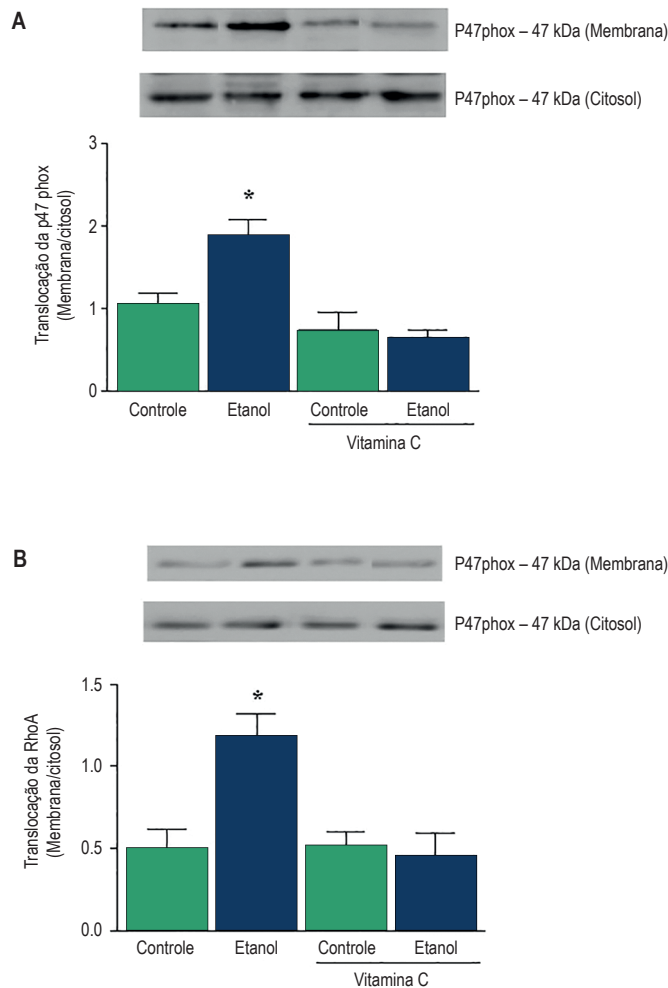


Figura 5 - Efeitos da ingestão aguda de etanol sobre a translocação da p47phox e RhoA no leito arterial mesentérico (LAM) de rato. O gráfico de barra representa a translocação da p47phox e RhoA como razão da expressão membrana/citosol (A e B) no LAM de rato. Parte superior: resultados de western blotting. Resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média de 5-7 experimentos. *em comparação aos grupos controle, controle + vitamina C e etanol + vitamina C ($p < 0,05$, ANOVA).

Em culturas de células CMLV, a vitamina C preveniu a geração de O_2^- induzida pelo etanol, sugerindo que a inibição da NAD(P)H oxidase pela vitamina C também pode estar envolvida na diminuição da geração vascular de O_2^- induzida pelo etanol.

ADH é uma enzima que atua na metabolização do etanol, e é funcionalmente ativa na vasculatura.²⁹ Foi descrito anteriormente que metabólitos do etanol estão envolvidos nos efeitos vasculares estimulados pelo etanol.³⁰ Para determinar um possível papel dos metabólitos do etanol sobre a geração de O_2^- induzido por etanol em artérias de resistência, foi avaliado o efeito do 4-MP nesse processo. A inibição do metabolismo do etanol mediado pela ADH levou à diminuição da geração de O_2^- induzida pelo etanol na cultura de CMLV. Assim, apresentamos uma evidência de que um metabólito de etanol, possivelmente o acetaldeído, é responsável pela geração de ERO em artérias de resistência.

A NAD(P)H oxidase é a principal fonte de ERO na vasculatura. A prototípica, Nox fagocítica é composta por cinco subunidades – três subunidades citosólicas, p40phox, p47phox e p67phox, e dois componentes associados à membrana, denominados gp91phox (Nox2) e p22phox. O complexo enzimático encontra-se dissociado nas células de repouso, mas é rapidamente ativado à estimulação celular. A fosforilação da p47phox em um resíduo de serina inicia a ativação da enzima, desencadeando a formação de um complexo composto por subunidades citosólicas. Essa resposta é seguida pela translocação do complexo citosólico à membrana, e associação com as subunidades gp91phox e p22phox (citocromo b_{558}). Os componentes da NAD(P)H oxidase são expressos em células endoteliais e CMLV, e a translocação da subunidade p47phox mostrou-se essencial para a produção de ERO nessas células.³¹ Em nosso estudo, foi observado o aumento da translocação da p47phox em LAM de ratos tratados com etanol, e tal efeito foi

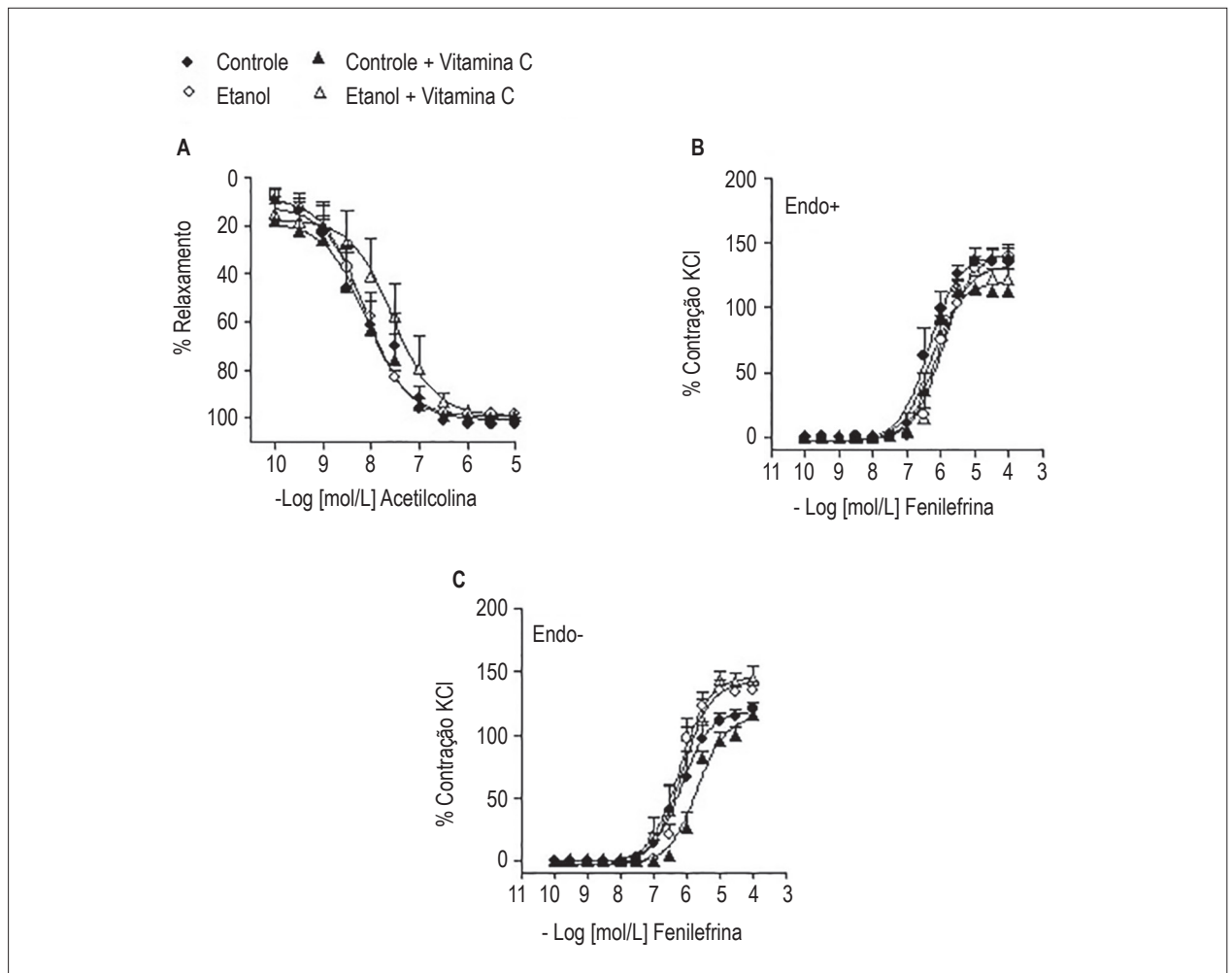


Figura 6 – Efeitos da ingestão aguda de etanol sobre a reatividade vascular à acetilcolina e fenilefrina. Curvas dose-resposta para acetilcolina foram obtidas no terceiro ramo das artérias mesentéricas com endotélio intacto (A). Curvas dose-resposta para fenilefrina foram obtidas nas artérias com endotélio (Endo+, B) e sem endotélio (Endo-, C). Resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média de 4-6 experimentos.

inibido pela vitamina C, sugerindo que o estresse oxidativo esteja envolvido na translocação da p47phox induzida pelo etanol e na ativação da NAD(P)H oxidase. Além disso, essa resposta reforça nossa ideia inicial de que a NAD(P)H oxidase esteja envolvida na geração de O_2^- induzida pelo etanol no LAM de rato. A ação inibitória da vitamina C sobre a translocação da p47phox foi previamente descrita.³² Os mecanismos pelos quais a vitamina C inibe a translocação da p47phox não foram totalmente elucidados, mas parecem envolver a inibição dos ativadores da enzima NAD(P)H oxidase. Um grande número de proteínas está envolvido no complexo NAD(P)H oxidase, que inclui Rac GTPases, proteína quinase C (PKC) e c-Src.¹¹ Papparella et al.³² demonstraram que a vitamina C inibiu a ativação da PKC com subsequente redução na translocação da p47phox e geração de ERO. O presente estudo não abordou o mecanismo exato pelo qual o etanol modula a atividade da NAD(P)H oxidase. Diferentes estímulos, tais como endotelina-1, angiotensina II, catecolaminas, trombina e fatores de crescimento (p.ex.: fator de crescimento epidérmico e fator de crescimento derivado de

plaquetas) promovem ativação aguda da NAD(P)H oxidase na vasculatura.³³ Nós demonstramos anteriormente que o losartan, um antagonista de receptores AT_1 , não impediu a geração de ERO induzida por etanol em LAM de rato,¹² descartando um possível papel da angiotensina II na ativação da NAD(P)H aqui descrita. Seria interessante outros estudos que avaliem a maneira exata que ingestão aguda de etanol induz a translocação de p47phox e a geração de ERO nas artérias de resistência.

O ânion superóxido é uma molécula altamente instável, reduzida à H_2O_2 pela SOD³⁴. Em nosso estudo, a ação antioxidante da vitamina C não estava relacionada com aumento da ativação da SOD, uma vez que não foi observada diferença na atividade da SOD no LAM após o tratamento com a vitamina. Além disso, uma vez que o tratamento com etanol não alterou a atividade da SOD, o aumento nos níveis de O_2^- induzido pelo etanol parece não estar relacionado com a redução da dismutação do O_2^- pela SOD. Tanto o O_2^- como o H_2O_2 atuam como moléculas de sinalização, sendo o H_2O_2 considerado o principal composto de sinalização,

dado sua relativa estabilidade e localização subcelular³⁴. Por exemplo, o H_2O_2 ativa vias sensíveis à sinalização redox, tais como MAPK e Rho quinase³⁵. H_2O_2 é intimamente regulado por enzimas intracelulares e extracelulares, incluindo CAT, que converte H_2O_2 em água e O_2 . Nossos resultados mostraram que a ingestão aguda de etanol não alterou os níveis de H_2O_2 ou a atividade da CAT no LAM de rato.

A disfunção endotelial é causada por um aumento na geração de ERO e redução na biodisponibilidade de NO, aumentando a inativação oxidativa do NO e/ou diminuindo sua síntese. No endotélio vascular, o NO é sintetizado pela eNOS. A Akt, uma proteína quinase serina/treonina, fosforila a eNOS, promovendo a ativação da enzima.³⁶ A fosforilação da eNOS no resíduo de Ser¹⁷⁷ é um requisito crucial para a ativação da eNOS, enquanto que a fosforilação no resíduo Tre⁴⁹⁵ leva à inativação da enzima.³⁶ Neste trabalho, demonstramos que o etanol não teve efeito sobre a fosforilação Akt/eNOS, o que corroborou a observação de que a concentração de nitrito no LAM de rato não foi afetada pelo etanol. O etanol induz um aumento transitório na atividade da SOD e CAT, e tal resposta pode mudar o equilíbrio entre EROs e NO em direção aos níveis de NO.³⁷ Nesse sentido, o aumento induzido por etanol nas defesas antioxidantes poderia explicar a ausência de efeito do etanol sobre os níveis de NO no LAM de rato.

As ERO derivadas da NAD(P)H oxidase na vasculatura ativam alvos redox-sensíveis tais como RhoA/Rho quinase. O ânion superóxido e H_2O_2 ativam a via RhoA/Rho quinase, que representa uma importante classe de moléculas sinalizadoras reguladas pelo estado redox no sistema cardiovascular.¹³ A via RhoA/Rho quinase regula muitas vias de sinalização intracelulares na vasculatura. A proteína Rho permanece em um ciclo entre sua forma inativa ligada ao GDP no citoplasma, e sua forma ativa ligada ao GTP na membrana celular,³⁸ e a translocação de RhoA para a membrana está associada com sua ativação. Os presentes achados mostraram que a ingestão de etanol aumentou a translocação de RhoA, o que sugere uma ativação da via RhoA/Rho quinase. Além do fato de a vitamina C ter prevenido a translocação de RhoA induzida pelo etanol sugerimos que essa resposta seja mediada por ERO. Esse resultado vai ao encontro de resultados anteriores mostrando que as ERO, principalmente O_2^- e H_2O_2 , estão ligados à ativação da via RhoA/Rho quinase.³⁹ Até nosso conhecimento, este é o primeiro estudo demonstrando uma interação direta entre ingestão de etanol, ERO derivadas de NAD(P)H oxidase, e a ativação da via de sinalização da RhoA/Rho quinase. A RhoA é abundantemente expressa nas CMLV e participa da vasoconstrição via fosforilação da cadeia leve de miosina e sensibilização das proteínas contráteis ao cálcio. Além disso, a ativação aumentada de RhoA foi associada à disfunção endotelial, resistência periférica aumentada e hipertensão.⁴⁰ Apesar da ativação da via de sinalização da RhoA/Rho quinase, a ingestão aguda de etanol não afetou a resposta contrátil induzida pela fenilefrina ou o relaxamento dependente do endotélio induzido por acetilcolina na artéria mesentérica. Esses resultados sugerem que a ativação da RhoA aqui descrita provavelmente ocorre antes do início das disfunções graves.

Algumas limitações do presente estudo devem ser consideradas. Em nosso estudo, todos os parâmetros foram avaliados quando o etanol atingiu sua concentração plasmática máxima. Não foi avaliado o período de ação do etanol na vasculatura após a administração de uma única dose. Portanto,

seria interessante a realização de estudos sobre o efeito de uma única dose de etanol ao longo do tempo. Outro ponto a ser considerado é que enquanto *binge drinking* em humanos é amplamente definido como o consumo de uma grande quantidade de etanol (4-5 doses) em um período de duas horas, em nosso estudo, a quantidade total de etanol (1g/kg) foi administrada em uma única dose.

A ativação da NAD(P)H oxidase, com aumento subsequente na geração de ERO, e a ativação das vias de sinalização redox-sensíveis, tais como a via RhoA/Rho quinase, são eventos importantes ligados à disfunção vascular e, segundo estudos anteriores,^{9,11,13} exercem um papel na fisiopatologia de várias doenças cardiovasculares. *Binge drinking* está associado a um risco aumentado de eventos cardiovasculares, tais como acidente vascular cerebral, morte súbita, infarto do miocárdio, maior mortalidade após infarto do miocárdio,^{2,4} e a progressão de aterosclerose carotídea.¹ Importante mencionar que mudanças na biologia vascular são mecanismos chaves para o risco aumentado de eventos cardiovasculares induzidos pelo consumo de álcool excessivo.⁶ Assim, nossos resultados levantam a possibilidade de que não somente a ingestão crônica de etanol seja um fator de risco para eventos cardiovasculares, como a ingestão aguda de etanol também pode aumentar o risco de causar danos vasculares pelo aumento da geração de ERO e ativação de vias redox-sensíveis. Em geral, essas respostas desencadeadas pelo etanol poderiam predispor ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

Conclusões

Em resumo, o principal achado inédito deste estudo é que a ingestão aguda de etanol induz a ativação da via RhoA/Rho quinase por um mecanismo que envolve a geração de ERO. Além disso, nós demonstramos, pela primeira vez, que o etanol ativa a NAD(P)H oxidase por estímulo da translocação da p47phox e por mecanismos redox-sensíveis em artérias de resistência.

Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa, Obtenção de dados e Análise estatística: Simplicio JA, Hipólito UV, Vale GT, Pereira CA; Análise e interpretação dos dados: Simplicio JA, Hipólito UV, Vale GT, Pereira CA, Tostes RC; Redação do manuscrito: Simplicio JA, Hipólito UV, Tirapelli CR; Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual importante: Callera GE, Touyz RM, Tostes RC, Tirapelli CR.

Potencial conflito de interesse

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

Fontes de financiamento

O presente estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

Vinculação acadêmica

Não há vinculação deste estudo a programas de pós-graduação.

Referências

1. Kauhanen J, Kaplan GA, Goldberg DE, Salonen R, Salonen JT. Pattern of alcohol drinking and progression of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19(12):3001-6.
2. Sundell L, Salomaa V, Vartiainen E, Poikolainen K, Laatikainen T. Increased stroke risk is related to a binge-drinking habit. *Stroke.* 2008;39:3179-84.
3. Wannamethee C, Shaper AG. Alcohol and sudden cardiac death. *Br Heart J.* 1992;68(5):443-8.
4. Bau PF, Bau CH, Naujorks AA, Rosito GA. Early and late effects of alcohol ingestion on blood pressure and endothelial function. *Alcohol.* 2005;37(1):53-8.
5. Hijmering ML, de Lange DW, Lorscheid A, Kraaijenhagen RJ, van de Wiel A. Binge drinking causes endothelial dysfunction, which is not prevented by wine polyphenols: a small trial in healthy volunteers. *Neth J Med.* 2007;65(1):29-35.
6. Goslawski M, Piano MR, Bian JT, Church EC, Szczurek M, Phillips SA. Binge drinking impairs vascular function in young adults. *J Am Coll Cardiol.* 2013;62(3):201-7.
7. Altura BM, Gebrewold A. α -Tocopherol attenuates alcohol-induced cerebral vascular damage in rats: possible role of oxidants in alcohol brain pathology and stroke. *Neurosci Lett.* 1996;220(3):207-10.
8. Yogi A, Callera GE, Hipólito UV, Silva CR, Touyz RM, Tirapelli CR. Ethanol-induced vasoconstriction is mediated via redox-sensitive cyclo-oxygenase-dependent mechanisms. *Clin Sci (Lond).* 2010;118(11):657-68.
9. Touyz RM, Briones AM. Reactive oxygen species and vascular biology: implications in human hypertension. *Hypertens Res.* 2011;34(1):5-14.
10. Ceron CS, Marchi KC, Muniz JJ, Tirapelli CR. Vascular oxidative stress: a key factor in the development of hypertension associated with ethanol consumption. *Curr Hypertens Rev.* 2014;10(4):213-22.
11. Lassègue B, San Martín A, Griendling KK. Biochemistry, physiology, and pathophysiology of NADPH oxidases in the cardiovascular system. *Circ Res.* 2012;110(10):1364-90.
12. Gonzaga NA, Callera GE, Yogi A, Mecawi AS, Antunes-Rodrigues J, Queiroz RH, et al. Acute ethanol intake induces mitogen-activated protein kinase activation, platelet-derived growth factor receptor phosphorylation, and oxidative stress in resistance arteries. *J Physiol Biochem.* 2014;70(2):509-23.
13. Montezano AC, Touyz RM. Reactive Oxygen Species, Vascular Nox, and Hypertension: Focus on Translational and Clinical Research. *Antioxid Redox Signal.* 2014;20(1):164-82.
14. Huie RE, Padmaja S. The reaction of NO with superoxide. *Free Radic Res Commun.* 1993;18(4):195-9.
15. Chen X, Touyz RM, Park JB, Schiffrin EL. Antioxidant effects of vitamins C and E are associated with altered activation of vascular NADPH oxidase and superoxide dismutase in stroke prone SHR. *Hypertension.* 2001;38(3Pt2):606-11.
16. Hipólito UV, Callera GE, Simplicio JA, De Martinis BS, Touyz RM, Tirapelli CR. Vitamin C prevents the endothelial dysfunction induced by acute ethanol intake. *Life Sci.* 2015;141:99-107.
17. Yogi A, Callera GE, Mecawi AS, Batalhão ME, Carnio EC, Antunes-Rodrigues J, et al. Acute ethanol intake induces superoxide anion generation and mitogen-activated protein kinase phosphorylation in rat aorta: a role for angiotensin type 1 receptor. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2012;264(3):470-8.
18. Yanardag R, Ozsoy-Sacan O, Ozdil S, Bolkent S. Combined effects of vitamin C, vitamin E, and sodium selenate supplementation on absolute ethanol-induced injury in various organs of rats. *Int J Toxicol.* 2007;26(6):513-23.
19. Cetin M, Devrim E, Serin Kiliçoglu S, Erguder IB, Namuslu M, Cetin R, et al. Ionic high-osmolar contrast medium causes oxidant stress in kidney tissue: partial protective role of ascorbic acid. *Ren Fail.* 2008;30(5):567-72.
20. Carda AP, Marchi KC, Rizzi E, Mecawi AS, Antunes-Rodrigues J, Padovan CM, et al. Acute restraint stress induces endothelial dysfunction: role of vasoconstrictor prostanoids and oxidative stress. *Stress.* 2015;18(2):1-11.
21. Callera GE, Tostes RC, Yogi A, Montezano AC, Touyz RM. Endothelin-1-induced oxidative stress in DOCA-salt hypertension involves NADPH-oxidase-independent mechanisms. *Clin Sci (Lond).* 2006;110(2):243-53.
22. Pereira CA, Ferreira NS, Mestriner FL, Antunes-Rodrigues J, Evora PR, Resstel LB, et al. Chronic fluoxetine treatment increases NO bioavailability and calcium-sensitive potassium channels activation in rat mesenteric resistance arteries. *Eur J Pharmacol.* 2015;765:375-83.
23. Callera GE, Touyz RM, Tostes RC, Yogi A, He Y, Malkinson S, et al. Aldosterone activates vascular p38MAP kinase and NADPH oxidase via c-Src. *Hypertension.* 2005;45(4):773-9.
24. Siow RC, Sato H, Leake DS, Pearson JD, Bannai S, Mann GE. Vitamin C protects human arterial smooth muscle cells against atherogenic lipoproteins: effects of antioxidant vitamins C and E on oxidized LDL-induced adaptive increases in cystine transport and glutathione. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18(10):1162-70.
25. Lange JE, Voas RB. Defining binge drinking quantities through resulting blood alcohol concentrations. *Psychol Addict Behav.* 2001;15(4):310-6.
26. Schlorff EC, Husain K, Somani SM. Dose- and time-dependent effects of ethanol on plasma antioxidant system in rat. *Alcohol.* 1999;17(2):97-105.
27. Pagano PJ, Ito Y, Tornheim K, Gallop PM, Tauber AI, Cohen RA. An NADPH oxidase superoxide-generating system in the rabbit aorta. *Am J Physiol.* 1995;268(6 Pt 2):H2274-80.
28. Gotoh N, Niki E. Rates of interactions of superoxide with vitamin E, vitamin C, and related compounds as measured by chemiluminescence. *Biochim Biophys Acta.* 1992;1115:201-7.
29. Haorah J, Knipe B, Leibhart J, Ghorpade A, Persidsky Y. Alcohol-induced oxidative stress in brain endothelial cells causes blood-brain barrier dysfunction. *J Leukoc Biol.* 2005;78(6):1223-32.
30. Rocha JT, Hipólito UV, Callera GE, Yogi A, Neto Filho Mdos A, Bendhack LM, et al. Ethanol induces vascular relaxation via redox-sensitive and nitric oxide-dependent pathways. *Vascul Pharmacol.* 2012;56(1-2):74-83.
31. Li M, Shah AM. Mechanism of endothelial cell NADPH oxidase activation by angiotensin II. Role of the p47phox subunit. *J Biol Chem.* 2003;278(14):12094-100.
32. Papparella I, Ceolotto G, Berto L, Cavalli M, Bova S, Cargnelli G, et al. Vitamin C prevents zidovudine-induced NAD(P)H oxidase activation and hypertension in the rat. *Cardiovasc Res.* 2007;73(2):432-8.
33. Lassegue B, Clempus RE. Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2003;285(2):R277-97.
34. Freinbichler W, Colivicchi MA, Stefanini C, Bianchi L, Ballini C, Misini B, et al. Highly reactive oxygen species: detection, formation, and possible functions. *Cell Mol Life Sci.* 2011;68(12):2067-79.
35. Guyton KZ, Liu Y, Gorospe M, Xu Q, Holbrook NJ. Activation of mitogen-activated protein kinase by H₂O₂. Role in cell survival following oxidant injury. *J Biol Chem.* 1996;271(8):4138-42.
36. Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, et al. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature.* 1999;399(6736):597-601.
37. Haorah J, Floreani NA, Knipe B, Persidsky Y. Stabilization of superoxide dismutase by acetyl-L-carnitine in human brain endothelium during alcohol exposure: novel protective approach. *Free Radic Biol Med.* 2011;51(8):1601-9.
38. Hall A. Small GTP-binding proteins and the regulation of the actin cytoskeleton. *Annu Rev Cell Biol.* 1994;10:31-54.
39. Jin L, Ying Z, Webb RC. Activation of Rho/Rho kinase signaling pathway by reactive oxygen species in rat aorta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;287(4):H1495-500.
40. Budzyn K, Marley PD, Sobey CG. Targeting Rho and Rho-kinase in the treatment of cardiovascular disease. *Trends Pharmacol Sci.* 2006;27(2):97-104.