

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**CHEILA JULIANA CÉSAR GOMES**

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE UM MODELO MURINO PARA  
O ETILISMO: AVALIAÇÃO DE PROPRIEDADES METABÓLICAS ASSOCIADA  
AO EFEITO CRÔNICO DA APOCININA**

**Maceió**

**2011**

**CHEILA JULIANA CÉSAR GOMES**

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE UM MODELO MURINO PARA  
O ETILISMO: AVALIAÇÃO DE PROPRIEDADES METABÓLICAS ASSOCIADA  
AO EFEITO CRÔNICO DA APOCININA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde (PPGCS) como requisito necessário para obtenção de título de mestre (MSc) do, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (ICBS), Universidade Federal de Alagoas (UFAL).

Área de concentração: Fisiologia e Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Luíza Antas Rabêlo.

**Maceió**

**2011**

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**  
**Bibliotecária Responsável: Fabiana Camargo dos Santos**

G633d Gomes, Cheila Juliana César.

Desenvolvimento e caracterização de um modelo murino para o etilismo: avaliação das propriedades metabólicas associada ao efeito crônico da apocinina / Cheila Juliana César Gomes. – 2011.

111 f. : il., tab.

Orientadora: Luíza Antas Rabêlo.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde: Fisiologia e farmacologia) - Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2011.

Bibliografia: f. 95-110.

Inclui anexos.

1. Álcool – Consumo crônico. 2. C57BL/6. 3. Apocinina. 4. Sensibilidade à insulina. 5. Esteatose hepática. 6. Balanço Redox. I. Título.

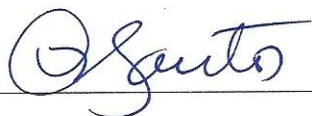
CDU:612.35



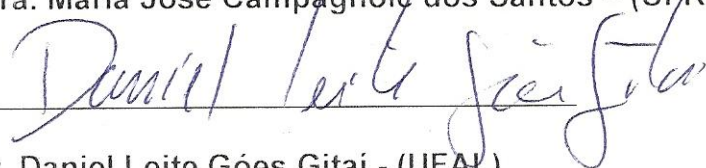
Defesa da Dissertação de Mestrado da aluna Cheila Juliana Cesar Gomes, intitulado: "Desenvolvimento e Caracterização de um modelo murino: avaliação das propriedades metabólicas associada ao efeito crônico da apocinina.", orientada pela Prof.<sup>a</sup> Dra. Luiza Antas Rabelo, apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Alagoas, em 18 de agosto de 2011.

Os membros da Banca Examinadora consideraram a candidata \_\_\_\_\_

Banca Examinadora:



Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria José Campagnole dos Santos – (UFERN)



Prof. Dr. Daniel Leite Góes Gitai - (UFAL)



Prof.<sup>a</sup> Dra. Fabiana de Andrade Cavalcante - (UFAL)

*Dedido a Deus,*

*A minha querida família, especialmente a Mamita e ao Papito e aos amigos.  
Eu não seria a mesma sem vocês!*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, particularmente, em oração, a Deus!  
Por me permitir chegar a este momento.

Aos meus lindos pais, Jaime e Darci (*in memoriam*) por todo amor dedicado a mim e a todos os bons exemplos que recebi;

Aos meus queridos irmãos Laura, Júlio, Jean e a toda família “César Gomes”, é muito bom ter todos vocês por perto!

*As Ciências Biológicas pela minha formação - às imagens mais lindas me foram proporcionadas por ela!*

*À Universidade Federal de Alagoas, uma mãe!*

*À Pós-graduação em Ciências da Saúde, pela oportunidade de Mestrado.*

*A todos do Laboratório de Reatividade Cardiovascular, LRC.*

*À Luíza Antas Rabêlo, pela orientação;*

Aos lindos amigos conquistados, pessoas simples que admiro e que tem a doçura na alma: Valéria Nunes de Souza, uma amiga-irmã, Glaucevane da Silva Guedes, ‘fortaleza em pessoa’, Anita Machado Gomes, tão boa amiga, amo vocês de graça!

À Lucas José Sá da Fonseca, admirável amigo; Marcos Antônio Eleutério da Silva, doce pessoa, Reidson Beiriz Verçosa e Carlos Alberto da Silva Jr.

À Luíza Fernandes, Halina Souza, Weriton Ferreira, Glauber Schettino, Flávio de Moura Resende, Alexandre Omena pelas muitas gentilezas.

*A todos os animais experimentais, essenciais à pesquisa biológica.*

*Aos camundongos C57BL/6, vulgo Black.*

Sem eles (infelizmente) a pesquisa experimental não avançaria e não acharia respostas essenciais à vida!

*Aos professores da Pós-graduação com os quais convivi,*

*Às novas amizades construídas com a turma de Mestrado 2009/2011,*

*Aos seminários que nos integravam.*

Aos Amigos do dia-a-dia - Aline Cavalcanti, Éverton Tenório, Thays Dias, Diogo José, Walfrido Bispo, Anansa Aquino, Yolanda Cupertino, Anne Porfírio, Luís Agra, Mariana Santos e Carolina Brito. Em especial, à profa. Magna Suzana Alexandre Moreira, Laboratório de Imunidade e Farmacologia, ICBS-UFAL.

*Aos Colaboradores, essenciais a este trabalho.*

À Professora Salete Smaniotto, Laboratório de Imunohistologia e Biologia Celular ‘Severinão’, ICBS - UFAL. As queridas técnicas Maria de Fátima Maia Sarmiento e Delma Paes de Souza, pelo auxílio e muitas dicas. Às queridas pessoas do Lab. de Biologia Celular, em particular, à Maria Danielma Reis, Larissa Oliveira, Altair Rogério Brandão, Thiago Carmo dos Santos, Cícero Fagner Lima e Rafael Vital se tornaram ao longo deste curso amigos e sempre me receberam com gentileza em seu laboratório.

Ao professor Antônio Euzébio Goulart Sant’ana e à Luciana da Silva Viana por sempre nos atender e nos conceder seu espaço e equipamentos, Laboratório de Recursos Naturais, IQB – UFAL.

À Professora Maria das Graças Souza de Moura Resende, médica patologista, pela sua prestimosa avaliação e contribuição a este trabalho no estadiamento do estudo hepático;

A todos os amigos que me incentivaram nas minhas decisões e festejaram comigo muitas conquistas;

A todos os citados e não citados que me auxiliaram a chegar a este momento,  
Eu os agradeço (*Vocês estão em meu coração!*).

A todas as agências de fomento à pesquisa: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas (FAPEAL) pelo apoio financeiro à bolsa de estudo, nível mestrado.

Sim!

Agradeço à Banca,

Pelo seu despendimento em avaliar este trabalho!

*“Eu levo seu coração comigo  
(eu o levo no meu coração)  
Eu nunca estou sem ele  
(onde quer que eu vá você irá, minha querida;  
e o que é feito só por mim é seu feito, minha amada)*

*Não temo o destino  
(pois você é meu destino, meu encanto)  
Não quero o mundo  
(pela beleza de você ser meu mundo, minha verdade)  
E você é tudo o que a lua sempre representou  
E tudo que um sol irá louvar será você*

*Eis o maior segredo que ninguém conhece  
(eis a raiz da raiz e o broto do broto  
e o céu do céu de uma árvore chamada vida;  
que cresce além do que a alma sonharia  
ou a mente poderia esconder)*

*E este é o milagre que mantém as estrelas afastadas  
Eu levo seu coração (eu o levo no meu coração).”*

**Edward Cumming.**

PS: dedicada à Mamita (*in memoriam*).



## RESUMO

O consumo crônico de etanol é associado a vários problemas hepáticos, a insensibilidade à insulina, desregulação do metabolismo da glicose e lipídeos e estresse oxidativo. No entanto, estudos mostram que alterações no metabolismo e a ocorrência de outros eventos dependem do padrão de consumo. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo desenvolver e caracterizar um modelo murino para o etilismo e avaliar o efeito concomitante da apocinina durante o consumo de etanol. Foram utilizados camundongos C57BL/6 machos, divididos em quatro grupos experimentais randomizados e mantidos em gaiolas coletivas, de acordo com a dieta líquida: grupo controle (CT; n=07) – água mineral; grupo isocalórico (ISO; n=07) – solução de 290,5 g/L de sacarose; grupo etanol (EtOH; n=7-9) – solução etanol a 20% v/v em dosagem gradual, iniciando com 5% v/v na primeira semana, 10% v/v na segunda semana e 20% v/v na terceira semana e grupo etanol mais apocinina (EtOHapo; n=7-9) – similar ao grupo EtOH, este recebeu uma solução a 20% de etanol mais a dose de 50 mg/Kg de apocinina. Foram realizados o acompanhamento do peso corporal, o consumo líquido e de ração, pressão arterial sistólica por plestimografia de cauda (PAS), teste de tolerância à glicose e de sensibilidade à insulina, perfil lipídico. No fígado, avaliou-se o perfil lipídico, peroxidação lipídica, a atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) e da catalase (CAT) e estudo histopatológico. Os dados mostraram que o EtOHapo exibiu menor de peso corporal ao final do tratamento etanólico, apesar da maior quantidade de calorias fornecidas na dieta líquida. O perfil biométrico apresentou padrão de normalidade para os grupos após 14 semanas. Contudo, a adiposidade foi menor nos grupos tratados com etanol e etanol mais apocinina. O etanol induziu maior sensibilidade à insulina e apocinina ampliou significativamente esta resposta. A PAS não foi alterada durante o tratamento etílico durante as 12 primeiras semanas de tratamento. Os níveis de lipídeos e de triglicérides no fígado apresentaram-se elevado nos grupos tratados com sacarose e etanol, porém eles não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si. Para o balanço redox hepático, houve redução da peroxidação lipídica nos camundongos tratados apenas com etanol e etanol mais apocinina quando comparados com os controles. A CAT e a SOD não apresentaram alterações de atividade estatisticamente significante entre os grupos ao fim das 14 semanas de tratamento. Os achados histológicos revelaram mudanças significativas no tecido hepático nos camundongos tratados com etanol ou etanol mais apocinina. O EtOH desenvolveu esteatose microvesicular, porém a adição da apocinina inibiu este processo. Houve uma redução da atividade da AST e AST/ALT nos animais que receberam etanol na dieta. Em conclusão, o tratamento etílico leve por 14 semanas melhorou a sensibilidade à insulina e reduziu o ganho de peso corporal. Apesar da cronicidade, o consumo moderado de álcool não promoveu estresse oxidativo tecidual hepático em camundongos C57BL/6 machos, reduzindo a peroxidação lipídica e inalterando a atividade das enzimas SOD e CAT. O tratamento alcoólico apenas induziu uma esteatose microvesicular e o tratamento com apocinina diminuiu este processo.

**Palavras-Chave:** Consumo crônico de álcool. C57BL/6. Apocinina. Sensibilidade à insulina. Esteatose hepática. Balanço REDOX.

## ABSTRACT

The chronic consumption of alcohol is associated with several hepatic disorders, the developments of insulin resistance, disrupts glucose and lipid homeostasis and oxidative stress. Moreover, the researches display that change in the metabolism and the others events depend of the pattern of drinking. In this study, the objective was to develop and to characterize a murine model for ethanol feeding and assessment of the apocynin effects during the ethanol consumption. C57BL/6 male mice, aged 3-5 months, weighting  $22,7 \pm 0,46$  g, were divided in four experimental and randomized groups were kept in collective and given a liquid diet as follows: control group (CT; n=07) – mineral water; isocalórico group (ISO; n=07) – solution 290,5 g/L of sucrose; ethanol group (EtOH; n=07 to 09) – ethanol solution 20% v/v in a gradual dosage starting with 5% v/v in first week and 10% v/v in the second and 20% in the third week and ethanol plus apocynin group (EtOHapo; n=07 to 09) – likewise the EtOH group, this group received an ethanol solution 20% v/v in a gradual dosage plus apocynin 50 mg/Kg. Mice body weight, the food and liquid intake, systolic blood pressure by pletismography, the glucose tolerance test (TTG) and insulin tolerance test (TTI), profile lipid and lipid peroxidation in the serum and the antioxidant activity enzyme catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), histological and diagnostic categorization studies were verified throughout the experimental period. The dates showed that the EtOHapo group showed less gain of body weight at the end of treatment, in spite of the great calories supplied on liquid diet. The biometric profile showed similar for the groups, but the adipose deposition was lesser in the group treated with ethanol plus apocynin (EtOHapo). The ethanol induced major insulin sensitivity and the apocynin improved this outcome. Blood pressure was not shown to be altered by the liquid diet consumption. The lipid and triglycerides levels in the liver were elevated in treated groups with sucrose and ethanol, but did not have difference statistical significant between then. On the redox balance in the liver, there were reduction of lipid peroxidation (MDA levels) in the mouse treated with alcohol alone (EtOH) and alcohol plus apocynin (EtOHapo) when they are compare with the controls groups. The CAT and SOD did not showed statistical difference among the groups at the end of 14 weeks of treatment. The histological findings did not revealed significant changes in the hepatic tissue in the mouse treated with ethanol or ethanol plus apocynin. The EtOH group developed microvesicular steatosis, but the apocynin inhibited this process. The serum level of ALT and AST/ALT rate had their activities reduced. In conclusion, the mild alcoholic treatment of 14 weeks improved the sensibility insulin, with reduced of body weight gain. The rather of the chronic, but moderate consumption of alcohol did not promoted oxidative stress in the liver of male mice C57BL/6, however decreased of lipid peroxidation and not changed the antioxidant enzymes activity (SOD e CAT). The alcoholic treatment only induced the microvesicular steatosis, but the treatment with apocynin averted the steatosis.

**Keywords :** *Chronic alcohol consumption. C57BL/6. Apocynin. Sensitivity insulin. Hepatic steatosis. Redox balance.*

## RÉSUMÉ

Le consommation chronique d'éthanol est associée à plusieurs maladies du foie, au développement de l'insulino-résistance, à la dysrégulation du métabolisme du glucose des lipides et du stress oxydant. Cependant, les recherches montrent que le changement du métabolisme et d'autres situations sont liées au niveau de la consommation. Ce travail se donne pour objectif de développer et caractériser un modèle murine pour l'étilisme et d'évaluer les effets de l'apocynine pendant la consommation d'éthanol. Pour cela, nous avons utilisé des souris C57BL/6 mâles, âgés de 3-5 mois avec  $22,7 \pm 0,46$  g. Ils ont été partagés en quatre groupes expérimentaux randomisés et gardés dans des cages collectives, selon le régime liquide: groupe de contrôle (CT; n=7) – de l'eau minérale; groupe de isocalorique (ISO; n=7) – de la solution de 290,5 g/L de saccharose; groupe d'éthanol (EtOH; n=7-9) – solution d'éthanol à 20% à la dose progressivement, Il été commencée avec 5% v/v dans la première semaine, 10% v/v dans la deuxième semaine et 20% v/v dans la troisième semaine et le groupe éthanol plus apocynine (EtOHapo; n=7-9) – similaire au groupe EtOH, ce groupe a reçue une solution de l'éthanol plus l'apocynine plus le dosage de 50 mg/kg. Pendant le travail de recherche, nous avons suivi le poids corporel et la consommation des liquides et de ration, de la pression artérielle systolique par pléthysmographie queue, du teste de tolérance au glucose et de la sensibilité à insuline et le profil lipidique. Par rapport au foie, nous avons évalué le profil lipidique, peroxydation lipidique, l'activité enzymatique de la superoxyde dismutase (SOD) et la catalase (CAT) et l'étude histopathologique. Les données montrent que le groupe EtOHapo a présenté une différence importante par rapport au poids corporel à la fin du traitement à base d'éthanol, en dépit d'une plus grande quantité de calories fournies par le régime liquide. Le profil biométrique montre le schéma normal pour les groupes après 14 semaines, toutefois l'adiposité a été plus petites dans les groupes qui ont reçue l'éthanol et l'éthanol plus apocynine. L'éthanol induit à une plus grande sensibilité et l'apocynine a augmenté cette réponse. La pression artérielle systolique n'a été pas modifiée au cours des 12 premières semaines du traitement d'alcoolisme. Les taux des lipides et des tryglicérides dans le foie étaient élevés dans le group traités à base de saccharose et d'éthanol, mais ils n'ont présenté aucune différence statistiquement importante entre eux. Pour l'équilibre redox hépatique, la peroxydation lipidique a été réduite chez les souris traitées avec de l'éthanol et de l'éthanol plus apocynine par rapport aux groupes contrôles. La CAT et la SOD n'ont montré aucun changement d'activité statistiquement importante entre eux à la fin des 14 semaines de traitement. Les résultats histologiques ont révélé simple stéatose microvésiculaire dans le groupe traités avec de l'éthanol tandis que le groupe de l'éthanol plus apocynine n'a pas développé stéatose. En guise de conclusion, le traitement alcoolique modéré pendant 14 semaines a amélioré la sensibilité à l'insuline et a réduit le gain de poids corporel, malgré de la chronicité. La consommation modérée d'éthanol n'a pas favorisé le stress oxydatif du tissu hépatique pour les souris C57BL/6 mâles, réduisant la peroxydation lipidique et immuable l'activité des enzymes CAT et SOD. Le traitement alcoolique pendant 14 semaines induit la stéatose microvésiculaire et l'apocynine réduit ce processus.

**Mot-clés:** *Le consommation chronique d'alcool. C57BL/6. Apocynine. Sensibilité à l'insuline. Stéatosis hépatique. Équilibre REDOX.*

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** – Estimativa para o consumo de etanol puro *per capita* para a população de cada país, com idade superior ou igual a 15 anos para dados registrados e não-registrados, 2005.....24
- FIGURA 2** – Metabolismo oxidativo do álcool.....29
- FIGURA 3** – Dinâmica de cicatrização do tecido hepático.....34
- FIGURA 4** – Estrutura da NADPH oxidase fagocítica.....38
- FIGURA 5** – Formação de dímeros de apocinina.....41
- FIGURA 6** – Mecanismo de inibição da NADPH oxidase pela apocinina.....42
- FIGURA 7** – Princípio do ensaio da atividade da Superóxido dismutase (SOD).....56
- FIGURA 8** – (a) Peso corporal dos camundongos tratados após 14 semanas em dieta líquida alcoólica. (b) média do consumo energético em kcal/dia normalizado pelo peso corporal em gramas.....62
- FIGURA 9** – a) Teste de Tolerância à glicose intraperitoneal realizando em período de jejum alimentar sólido noturno b) Área sob a curva do teste de tolerância. c) Teste de Sensibilidade à insulina intraperitoneal e sua área sob a curva em d).....64
- FIGURA 10** – Pressão arterial sistólica (PAS) temporal (Basal à 12ª semana de tratamento alcoólico) avaliada por plestimografia de cauda dos C57BL/6 tratados por 14 semanas com dieta líquida – água mineral (CT), sacarose [290,5g/L] (ISO) e solução etílica 20% v/v (EtOH) e solução de etanol 20% mais Apocinina (50 mg/kg).....65
- FIGURA 11** – Pressão arterial sistólica (PAS) e Frequência cardíaca (FC) avaliadas no tempo final (12ª semana de tratamento alcoólico) por plestimografia de cauda dos C57BL/6 tratados por 14 semanas com dieta líquida – água mineral (CT=04), sacarose [290,5g/L] (ISO=04) e solução etílica 20% v/v (EtOH=05) e solução de etanol 20% mais Apocinina (50 mg/kg; EtOHapo=05).....66
- FIGURA 12** – Lipídios totais hepáticos (a); Lipídios totais/ peso hepático (b); triglicerídios (c), e colesterol (d) hepático dos camundongos C57BL/6 tratados por 14 semanas em dieta alcoólica.....68
- FIGURA 13** – Triglicerídeos (a) e Colesterol (b) plasmático total obtido após as 14 semanas de tratamento em dieta líquida alcoólica e apocinina.....69
- FIGURA 14** - Peroxidação lipídica hepática (a) e plasmática (b) em concentração de malonildialdeído por miligrama de proteína hepática e plasmática após 14 semanas de dieta alcoólica e apocinina.....70

- FIGURA 15** – Atividade da Superóxido dismutase (a), em percentual de inibição da xantina oxidase por miligrama de proteína hepática e da Catalase (b) nos camundongos.....70
- FIGURA 16** - Quantificação de micro e macrovacúolos (método semiquantitativo) nos C57BL/6 tratados por 14 semanas com dieta alcoólica e apocinina. Amostra de sete a nove animais por grupo.....72
- FIGURA 17** - Secções histológicas de fígado (4-6µm) coradas em H&E dos C57BL/6 tratados por 14 semanas com dieta líquida alcoólica – água mineral (CT; a), sacarose [290,5g/l] (ISO; b) e solução etílica 20% v/v (EtOH; c) e solução 20% de etanol mais apocinina (50mg/kg; d). Aumento de 400x. MO.....76
- FIGURA 18** - Secções histológicas (4-6µm) coradas em tricromo de Masson dos C57BL/6 tratados por 14 semanas com dieta líquida – água mineral (CT;a), sacarose [290,5g/L] (ISO; b) e solução etílica 20% v/v (EtOH; c) e solução de etanol 20% mais apocinina (50mg/kg; d). Aumento 200x. MO.....77

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b> – Efeitos da apocinina em modelos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .....	40
<b>TABELA 2</b> – Características gerais do consumo alimentar.....	63
<b>TABELA 3</b> – Características biométricas dos camundongos submetidos ao protocolo dietético etílico.....	66
<b>TABELA 4</b> – Características teciduais dos camundongos submetidos ao protocolo dietético etílico.....	67
<b>TABELA 5</b> – Atividade enzimática dos principais marcadores de injúria hepática e níveis plasmáticos de albumina e proteínas totais.....	71
<b>TABELA 6</b> – Estadiamento histopatológico para modelo animal de esteatohepatite avaliado através das lâminas de hematoxilina-eosina e tricromo de Masson dos animais C57BL/6 tratados por 14 semanas em dieta alcoólica e apocinina.....	74

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ADH</b>	Álcool desidrogenase
<b>AlfaSMA (<math>\alpha</math>-SMA)</b>	$\alpha$ actina do músculo liso
<b>ALD</b>	Doença hepática de origem alcoólica
<b>ALT</b>	Alanina aminotransferase
<b>AST</b>	Aspartato aminotransferase
<b>ATP</b>	Trifosfato de adenosina
<b>BSA</b>	Albumina de soro bovino
<b>CAT</b>	Catalase
<b>CrebA</b>	Proteína A de Ligação a Elemento de Resposta do AMPc Cíclico
<b>CT</b>	Controle
<b>CTLA-4</b>	Antígeno 4 de linfócito T citotóxico
<b>DL<sub>50</sub></b>	Dose letal média
<b>EtOH</b>	Etanol
<b>EtOHapo</b>	Etanol mais apocinina
<b>EROs</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>FAL</b>	Fosfatase alcalina
<b>FC</b>	Frequência cardíaca
<b>GABAAR</b>	Receptor A do ácido gama-aminobutírico
<b>GLP-1</b>	Peptídeo-1 semelhante ao glucagon
<b>GLP-2</b>	Peptídeo-2 semelhante ao glucagon
<b><math>\gamma</math>-GT</b>	Gama glutamil transferase
<b>GPx</b>	Glutaciona peroxidase
<b>GR</b>	Glutaciona redutase
<b>GSH</b>	Glutaciona reduzida ou glutaciona
<b>GSH/GSSG</b>	Glutaciona reduzida/glutaciona oxidada
<b>GSHmt</b>	Glutaciona mitocondrial
<b>GSSG</b>	Glutaciona oxidada ou dissulfídica
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrogênio
<b>HUVEC</b>	<i>Human umbilical vein endothelial cells</i>
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentração inibitória média
<b>ISO</b>	Isocalórico

<b>IL-1</b>	Interleucina beta 1
<b>IL-2</b>	Interleucina 2
<b>IL-6</b>	Interleucina 6
<b>IL-10</b>	Interleucina 10
<b>IL-12</b>	Interleucina 12
<b>INF<math>\gamma</math></b>	Interferon gama
<b>KCl</b>	Cloreto de potássio
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Diidrogenofosfato de potássio
<b>LDH</b>	Lactato desidrogenase
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeo
<b>MDA</b>	Malonildialdeído
<b>Mm</b>	Milimolar
<b>MPO</b>	Mieloperoxidase
<b>MP-PON2<sup>0</sup></b>	Macrófago peritoneal deficiente da Paraoxonase-2
<b>NaCl</b>	Cloreto de sódio
<b>NADPH</b>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
<b>NADPH oxidase</b>	Complexo multienzimático NADPH oxidase
<b>NAFLD</b>	Espectro de doença hepática gordurosa de origem não-alcoólica
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	Hidrogenofosfato dissódico
<b>NASH</b>	Esteatohepatite não-alcoólica
<b>NMDA</b>	N-metil D-aspartato
<b>•NO</b>	Radical óxido nítrico
<b>NOXs</b>	NADPH oxidases
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>•O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Ânion radical superóxido
<b>ONOO<sup>-</sup></b>	Ânion peroxinitrito
<b>PAD</b>	Pressão arterial diastólica
<b>PAS</b>	Pressão arterial sistólica
<b>PBMC</b>	Células mononucleares de sangue periférico
<b>PCR</b>	Proteína C reativa
<b>PF</b>	Ponto de fusão
<b>PON2</b>	Paraoxonase 2
<b>PPAR<math>\alpha</math></b>	Receptor alfa ativado de proliferador de peroxissoma
<b>rac 1</b>	<i>Rho-GTPase cycle 1</i>



<b>rac 2</b>	<i>Rho-GTPase cycle 2</i>
<b>RIPA</b>	<i>Radioimmunoprecipitation assay buffer</i>
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sódio
<b>SOD</b>	Superóxido dismutase
<b>SOD1</b>	Superóxido dismutase 1
<b>SOD2</b>	Superóxido dismutase 2
<b>TAP2</b>	Proteína transportadora de peptídeos 2
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral
<b>TGF<math>\beta</math></b>	Fator de crescimento transformante $\beta$
<b>TDGF</b>	Fator de crescimento derivado de teratocarcinoma
<b>VLDL</b>	<i>Very low density lipoprotein</i>

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	19
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	22
3	<b>REVISÃO A LITERATURA</b> .....	23
3.1	<b>Epidemiologia</b> .....	23
3.2	<b>Farmacologia do etanol</b> .....	26
3.3	<b>Doença hepática alcoólica (DHA)</b> .....	30
3.4	<b>Hipertensão secundária ao álcool</b> .....	35
3.5	<b>Complexo enzimático NADPH oxidase e Inibidores</b> .....	37
3.6	<b>Modelos animais para dietas alcoólicas</b> .....	45
4	<b>MATERIAIS &amp; MÉTODOS</b> .....	47
4.1	<b>Materiais</b> .....	47
4.1.1	Animais.....	47
4.1.2	Lista de Soluções & Reagentes.....	47
4.1.3	Procedência dos Reagentes & Substâncias.....	48
4.2	<b>Métodos</b> .....	50
4.2.1	Desenho Experimental.....	50
4.2.2	Determinação do peso corporal e consumo.....	50
4.2.2	Peso corporal.....	51
4.2.2.2	Consumo líquido e alimentar.....	51
4.2.3	Teste de tolerância à glicose.....	51
4.2.4	Teste de sensibilidade à insulina.....	52
4.2.5	Determinação da pressão arterial sistólica (PAS) e da frequência cardíaca (FC).....	52
4.2.6	Sacrifício dos animais e coleta dos tecidos.....	53
4.2.7	Medida de crescimento corporal.....	53
4.2.8	Perfil lipídico plasmático.....	53
4.2.9	Avaliação hepática.....	54
4.2.9.1	Perfil lipídico hepático.....	54
4.2.9.2	Balço Redox.....	55
4.2.9.3	Medida atividade da superóxido dismutase (SOD).....	55
4.2.9.4	Medida da atividade da catalase (CAT).....	56
4.2.9.5	Peroxidação lipídica hepática e sistêmica.....	56
4.2.10	Morfologia hepática.....	57
4.2.10.1	Coloração hematoxilina-eosina (H&A).....	57
4.2.10.2	Coloração Tricromo de Masson.....	58
4.2.10.3	Quantificação de vacúolos.....	58
4.2.10.4	Estadiamento histopatológico.....	59
4.2.11	Atividade enzimática dos principais marcadores de lesão hepática e níveis séricos de proteínas totais e albumina.....	59
4.2.12	Análise e expressão dos dados.....	60
5	<b>RESULTADOS</b> .....	61
5.1	<b>Avaliação do peso corpóreo e consumo dos camundongos C57BL/6</b> .....	61
5.2	<b>Avaliação do consumo de líquidos e de ração</b> .....	62
5.3	<b>Perfil glicêmico do TTG e TSI</b> .....	63
5.4	<b>Pressão arterial sistólica (PAS) e frequência cardíaca (FC)</b> .....	65
5.5	<b>Avaliação do perfil biométrico</b> .....	66
5.6	<b>Avaliação do perfil lipídico hepático</b> .....	67

<b>5.7</b>	<b>Avaliação do perfil lipídico plasmático.....</b>	<b>68</b>
<b>5.8</b>	<b>Avaliação do balanço REDOX.....</b>	<b>69</b>
5.8.1	Peroxidação lipídica hepática e plasmática.....	69
5.8.2	Superóxido dismutase (SOD) e Catalase (CAT).....	70
<b>5.9</b>	<b>Atividade enzimática dos principais marcadores de lesão hepática e níveis séricos de proteínas totais e albumina.....</b>	<b>71</b>
<b>5.10</b>	<b>Avaliação histopatológica hepática.....</b>	<b>71</b>
5.10.1	Quantificação de vacúolos.....	71
5.10.2	Estadiamento para doença hepática alcoólica (DHA).....	72
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>78</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>94</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>95</b>
	<b>ANEXO.....</b>	<b>111</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Ao longo da história, o hábito do consumo de bebidas alcoólicas tem-se associado a vários efeitos, tanto positivos quanto prejudiciais à saúde. Vários estudos epidemiológicos se referem aos efeitos benéficos e prejudiciais do álcool ligados ao volume de consumo, ao estilo de vida e a fatores dietéticos (Kloner & Reskalla, 2007). Além disso, muito se deduz a respeito da possível indicação de bebidas alcoólicas em dose leve a moderada para o consumo rotineiro e inclusão em dietas. No entanto, devido a respostas ainda controversas nestas pesquisas sobre possíveis efeitos benéficos sobre a saúde, ainda não é possível a sua recomendação para o uso habitual (Waki et al, 2005).

Para o consumo leve a moderado de bebidas alcoólicas, o álcool é descrito possuir efeito protetor para o desenvolvimento da resistência à insulina, diabetes tipo 2 e eventos cardiovasculares, enquanto o consumo maciço e a abstinência total está ligada ao aumento do risco dessas doenças (Howard, Arnsten & Gourevitch, 2004; Carlsson et al, 2005; Koppes et al, 2005). O risco está associado à exposição exagerada de bebidas alcoólicas, podendo ocasionar uma resposta inversa e provocar a elevação da morbidade por complicações do diabetes mellitus e desagravos cardiovasculares (Grønbaek et al, 2004). O mecanismo exato para explicar este fato ainda é desconhecido pelos pesquisadores. No entanto, o processo parece envolver uma desregulação do metabolismo de carboidratos, levando ao desenvolvimento de resistência à insulina, caracterizada pela hiperglicemia de jejum e no estado alimentado (Avogaro & Tiengo, 1993) e que, possivelmente, uma segunda via de sinalização da insulina, a Cbl/TC10 possa estar desregulada no tecido adiposo e ocasionar esses eventos (Sebastian & Nagy, 2005).

O último relatório publicado pela Organização Mundial de Saúde (OMS), ainda com dados obtidos a partir do Relatório de Situação Global sobre o Álcool (WHO Global Status Report on Alcohol, 2004) e o do Sistema de Informação Global sobre Álcool e Saúde (WHO Global Information System on Alcohol and Health) que realiza regularmente atualizações a respeito do assunto, classifica o consumo de bebidas alcoólicas como a terceira causa de morte entre as que poderiam ser evitáveis e de incapacitação.

A Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Envolvendo a Saúde (CID-10) relaciona o uso do álcool entre as causas primárias de mais de 30 doenças e mais outras 200, têm o álcool como um dos fatores de causa. Entre as doenças mais comuns

estão as que envolvem eventos cardíacos, seguidas de neoplasias específicas, cirrose hepática e distúrbios psiquiátricos. Anualmente, o álcool provoca cerca de 2,5 milhões de mortes, principalmente entre homens jovens. Entretanto, em concomitância, ocorre uma redução de risco de mortes pelos diabetes mellitus (-8,3%) e doenças cardiovasculares (-91,7%) (WHO, 2011).

Um dos fatores que pode confundir a relação do consumo do álcool e a presença de resistência à insulina é a disfunção hepática. Efeitos do consumo alcoólico regular, observados na adiposidade visceral e durante a disfunção hepática são comumente confundidos durante o estado de obesidade (Wakabayashi, 2011). Dislipidemias, distúrbios cardíacos e aumento da obesidade visceral são comuns em ambas as situações. O fígado, como órgão central na manutenção saudável do organismo, é um dos primeiros sítios de ação direta do etanol através do seu metabolismo oxidativo. Para combater os efeitos deletérios da produção descompensada de espécies reativas de oxigênio (EROs), muitas substâncias têm sido testadas como inibidores da NADPH oxidase e fármacos que reduzam a resistência à insulina.

Os indutores periféricos de sensibilidade para o receptor da insulina, como a metformina e as glitazonas, apresentam sucesso neste tipo de tratamento em camundongos (Bergheim et al, 2006), e especificamente a Pío e a Rosiglitazona, além de outros agonistas desta classe que agem em receptores alfa ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR $\alpha$ ) mostram inibir o estado de inflamação e diminuem níveis de TNF $\alpha$ , porém podem ocasionar anormalidades mitocondriais (Hernandez et al, 2004; Iwata et al, 2001). Em contraste, os antioxidantes são reconhecidos como substituintes eficazes. Exemplifica-se com a glutatona, miméticos da superóxido dismutase, o tocoferol e a ubiquinona. Esses, por sua vez, têm sido propostos para o tratamento de problemas hepáticos, pois, presumivelmente, atuam diretamente na causa do problema, o estresse oxidativo. Contudo, provocam resultados ainda duvidosos e muitas vezes, controversos (Sanyal et al, 2004; Covey et al, 2006).

O estudo com outras substâncias farmacológicas eficazes para tratamento da origem do estresse oxidativo, porém focado em estratégias de inibição enzimática, e que acentuem o sistema endógeno antioxidante tem se apresentado interessante para pesquisas em processos oxidativos, apresentando resultados mais positivos do que a suplementação com antioxidantes (Day, 2004). Modelos experimentais testados mostram ainda diminuir a peroxidação lipídica com uso de suplementações com antioxidantes ou inibidores de geração de radicais livres,

reduzindo a presença de necrose focal e inflamação no fígado, e em alguns casos, melhorando a esteatose (Arteel, 2003; Nanji, 2004). No entanto, estas não demonstram reduzir a hipertensão e outros acidentes cardiovasculares em tratamento de longo período (Pechánová & Simko, 2009). Neste cenário, ganham destaque os bloqueadores da produção das EROs, através da inibição enzimática das maiores fontes de radicais livres, tais como o complexo NADPH oxidase e a citocromo P450 2E1.

A apocinina é uma substância bem descrita na literatura, possui a capacidade de inibir o complexo enzimático NADPH, atuando de maneira eficaz na inibição da maior fonte de ânion radical superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) em células fagocíticas e não-fagocíticas, além de apresentar-se como uma substância com potencial antioxidante (Stefanska & Pawliczak, 2008). Seu uso terapêutico para o tratamento da inflamação crônica mostrou-se bastante eficaz, igualando-se a eficácia do Ibuprofeno, um antiinflamatório não-esteróide, no tratamento da artrite reumatóide (Hougee et al, 2006). Outros trabalhos descrevem seu efeito neuroprotetor em camundongos (Tang et al, 2008), eficácia no tratamento da asma e inflamação (Doddo et al, 2004), na diminuição da aterosclerose e hipertensão (Viel et al, 2008). No entanto, após uma ampla revisão literária, observa-se que não há registros de estudos envolvendo uma possível ação da apocinina frente ao consumo crônico de etanol. Desta forma, diante das premissas levantadas, pareceu relevante ao nosso grupo estudar um possível efeito da apocinina tanto como uma substância antioxidante como inibidor do complexo NADPHox em modelo *in vivo*, neste utilizando-se camundongos isogênicos C57BL/6, frente ao efeito concomitante do uso crônico de etanol.

## **2. OBJETIVOS**

**2.1. Objetivo geral:** Desenvolver e caracterizar um modelo murino para o etilismo, avaliando a função cardiometabólica.

### **2.2. Objetivos específicos:**

Desenvolver e caracterizar um modelo murino crônico para o etílico de 14 semanas, avaliando concomitantemente os efeitos da apocinina em camundongos C57BL/6;

- Avaliar a tolerância à glicose e à sensibilidade à Insulina;
- Estudar o perfil lipídico sistêmico e hepático;
- Analisar a peroxidação lipídica plasmática e hepática;
- Avaliar o estado Redox hepático;
- Avaliar a função e a morfologia hepática.

### 3. REVISÃO A LITERATURA

#### 3.1. Epidemiologia

O abuso alcoólico e os problemas relacionados ao seu uso têm sido identificados como um importante fator de risco para injúrias e doenças crônicas. Mundialmente, o alcoolismo é reconhecido como um problema social e produz graves encargos à saúde pública e desordens provocadas pelo seu uso estão entre as doenças mais debilitantes (Rehm et al, 2004).

As categorias de identificação de doenças e injúrias causadas pelo álcool são definidas no espectro: desordens pelo uso do álcool, doença hepática de origem alcoólica e pancreatite de origem alcoólica, essas são as doenças em que a causa primária é de origem estritamente derivada do consumo alcoólico. A contribuição do consumo alcoólico nas doenças que não apresentam origem primária no álcool são alguns tipos específicos de neoplasias, complicações pré-natais, diabetes mellitus, transtorno unipolar (depressão), epilepsia, hipertensão, acidente vascular hemorrágico e isquêmico e as injúrias auto-infringida, intencionais e não-intencionais etc (Rehm et al, 2009).

A cada ano, mundialmente, cerca de 02 bilhões de pessoas consomem bebidas alcoólicas, equivalendo aproximadamente 40% (2 a cada 5 pessoas) da população global acima de 15 anos. Estima-se também que 02 a 2,5 milhões de pessoas morrem devido ao seu consumo nocivo (1,2 mortes para cada 100.000 habitantes), e isso, equivale a 6% de todas as causas de morte entre pessoas do sexo masculino e 1% para o sexo feminino (consumidores e não-consumidores) e representando 3,2% de todas as mortes e por 4% dos anos de vida útil. O custo global e anual do consumo nocivo varia entre 0,6 a 2,0% do Produto Interno Bruto (PIB) mundial (US\$ 210.000.000 a US\$ 615.000.000). Esses custos apresentam distribuição não-aleatória e acompanha o consumo *per capita* (Figura 01) (WHO, 2011).

Existe uma grande variação no consumo mundial de bebidas alcoólicas, a média global gira em torno de 6,2 litros por pessoa adulta/ano de etanol puro. Os países que apresentam maior consumo são os países do leste europeu (média de consumo de 11,9 L). Quando se compara todas as regiões do globo e a de menor consumo por pessoa adulta, enquadra-se o Mediterrâneo (média de consumo de 0,7 L) (WHO, 2011). Em todas as regiões do globo, o perfil de consumo entre os gêneros, apresenta o sexo masculino como maior





consumo em que há diminuição dos prejuízos e aumento dos benefícios à saúde, sendo considerados a influência dos gêneros e faixa etária (Drinking & You, 1998).

O Instituto Nacional sobre o Abuso de Álcool e Alcoolismo dos Estados Unidos (National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism, NIAAA) define que o uso moderado para se referir ao consumo que não cause prejuízos à saúde do bebedor e nem problemas sociais. A unidade definida por esse Instituto define o uso moderado até 14 unidades semanais (drinques) para homens e de 7 unidades para mulheres e pessoas acima de 65 anos até 3 unidades semanais (considerando a unidade-padrão de drinque de 14 g), com um a dois dias sem consumo na semana (Gunzerath et al, 2004).

A OMS classifica o consumo de bebidas alcoólicas no Brasil como estável e regular (WHO, 2011). Segundo o Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas (CEBRID), a dependência do álcool é condição frequente, atingindo cerca de 12,3% da população brasileira de 12 a 65 anos. Somando-se a isso, segundo pesquisa domiciliar realizada em 2005; entre os 7.939 entrevistados, escolhidos aleatoriamente e representativos das 108 cidades do Brasil com mais de 200 mil habitantes, observou-se que o uso de álcool na vida, nas diferentes regiões, variou de 53,9% na região norte a 80,4% na região sudeste. Nessa pesquisa também foi verificada que a taxa de dependentes de álcool variou de 12,7% na região sudeste a 13,8 % na região nordeste (Carlini et al, 2005).

Posterior a essa, o I Levantamento Nacional sobre os Padrões de Consumo de Álcool na População Brasileira (2007), maior pesquisa realizada e abrangente a todo o território nacional, representando a população acima de 14 anos. Foi verificado que 52% dos brasileiros podem ser considerados bebedores e praticamente metade (27%) faz uso ocasional ou raro, e a outra metade (25%) faz uso habitual, ao menos uma vez por semana.

### **3.2. Farmacologia do etanol**

O etanol ( $C_2H_5OH$ ), uma pequena molécula com caráter tanto hidrossolúvel e lipossolúvel, é rapidamente absorvido pelo trato gastrointestinal. Em jejum, a concentração máxima no sangue é alcançada em 30 minutos, porém pode variar até 90 minutos. A presença do alimento pode retardar a absorção alcoólica, devido a uma menor velocidade de esvaziamento gástrico. Após a ingestão do etanol, aproximadamente 20% é absorvido pelo

estômago e o restante nas primeiras porções do intestino delgado, passando pelo metabolismo hepático de primeira passagem. Assim, o máximo de 90% desta substância é oxidada pelo fígado e o restante eliminado pelos pulmões e rins. Exceto pelo estômago, o metabolismo extra-hepático do etanol, é insignificante (Lieber, 1997). Além disso, independentemente de sua concentração, o metabolismo do etanol possui cinética de ordem zero, não variando com o tempo em que ela foi ingerida e sua concentração. O consumo maciço está associado à desnutrição primária. Por apresentar apenas valor calórico (7,11 kcal/g), o etanol fornece uma grande quantidade de calorias, as “falsas calorias”, representando cerca de 50% do consumo diário de energia em um alcoólico crônico; prejudicando a ativação e utilização de nutrientes e secundariamente, a má digestão e absorção deles (Lieber, 2000).

A ampla distribuição do etanol pelos líquidos corporais permite altas concentrações desta substância em tecidos altamente vascularizados. Somando-se a sua capacidade de atravessar membranas biológicas e a ausência de receptores específicos para sua ação farmacológica, no tecido cerebral, sua concentração se eleva rapidamente, podendo interferir no funcionamento de receptores A do ácido gama-aminobutírico (GABAAR) (Ueno et al, 2001), sistema glutamínérgico (Carlezon & Nestler, 2002; Krystal et al, 2003), na sinalização de receptores nucleares, como a Proteína A de Ligação a Elemento de Resposta do AMPc Cíclico (*CrebA*) (Nestler, 2004), estimulação de neurônios dopaminérgicos (Gonzales et al, 2004) e outras implicações nos sistemas de neurotransmissores. Exemplifica-se a ação farmacológica em estruturas mesocorticolímbicas e amígdalas (Nestler, 2005).

As principais vias de metabolização do etanol a acetaldeído são a álcool e a aldeído desidrogenases, enzimas estas localizadas predominantemente no fígado (Figura 02), mas que podem ser encontradas no estômago e cérebro (Zimatkin & Buben, 2007). O segundo passo transforma o acetaldeído em acetato na mitocôndria através da enzima aldeído desidrogenase. O metabolismo principal do etanol envolve a participação da enzima citosólica álcool desidrogenase (ADH). Esta, por sua vez, catalisa a conversão do etanol em acetaldeído (Fujimiya et al, 2002).

Na oxidação do etanol pela ADH ocorre a formação de um mol de NADH para cada mol de etanol metabolizado (Lieber, 2000). Durante a conversão do etanol a acetaldeído, ocorre a transferência do íon hidrogênio do álcool para o co-fator  $\text{NAD}^+$ , formando NADH. Como resultado final, a oxidação do etanol produz um excesso de equivalentes redutores no órgão hepático, principalmente na forma NADH (Figura 02). Assim, a produção excessiva de NADH induz ao desbalanço do sistema redox  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  (Lieber, 2000).

Esses mecanismos, por sua vez, estão envolvidos em diversos distúrbios metabólicos, tais como aumento do alfa-glicerofosfato hepático, estímulo a síntese de ácidos graxos com concomitante diminuição da oxidação normal dos ácidos graxos com prejuízo da sinalização da insulina, e ao efeito antilipolítico no tecido adiposo periférico. O que pode contribuir para um aumento da adiposidade visceral hepática, conduzindo ao acúmulo excessivo de triglicerídeos no fígado, tornando-o gorduroso (Kang et al, 2007). Outras alterações que acompanham o alcoolismo crônico estão também envolvidas com a depleção de glutathione (GSH), um tripeptídeo antioxidante, a elevação dos níveis de homocisteína e ao estresse oxidativo, a diminuição da atividade da proteína quinase dependente de AMPc (PKA), a desregulação da sinalização de citocinas, indução a processos inflamatórios e diminuição da expressão de receptores PPAR $\alpha$  nucleares envolvidos na oxidação e transporte de ácidos graxos (Sozio & Crabb, 2008).

Duas outras importantes vias de metabolização do etanol são a do sistema microsomal de oxidação do etanol (SMOE) que se utiliza da enzima CYP2E1 e da Catalase (CAT). O SMOE é um sistema de oxidação mista, pertencente à superfamília de hemoproteínas que utilizam o NADPH como co-fator no metabolismo do etanol (Lieber, 2000). As enzimas do citocromo P450s são responsáveis por reações de desintoxicação, catalisando reações para componentes mais polares ou conduzi-los a reações de conjugação para serem excretados. Esse sistema catalisa diferentes reações químicas, incluindo a monooxigenação, peroxidação, redução, desalquilação e epoxidação (Cederbaum et al, 2008).

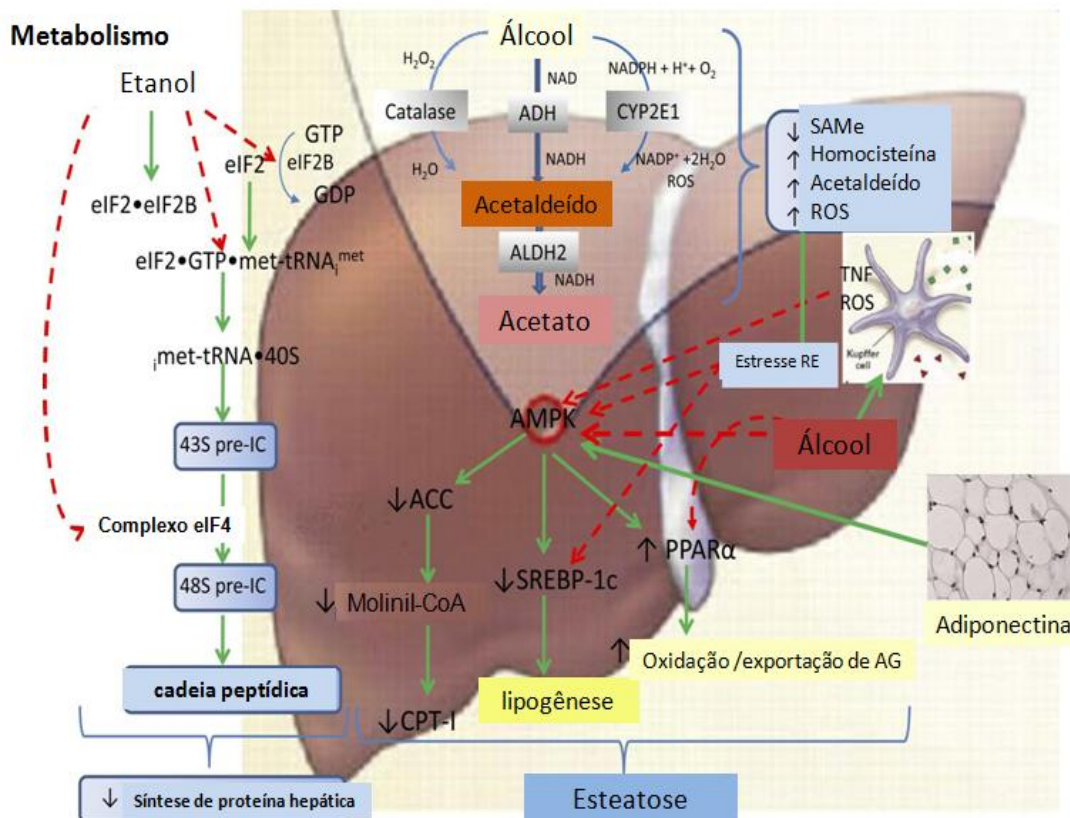
O SMOE (via da cronicidade ou induzível) é gradativamente estimulado pelo uso crônico do etanol. Dessa forma, em concentrações sanguíneas de 100mg/dL, apresenta uma constante cinética relativamente alta ( $K_m \sim 10$  mM), neste período, o sistema de oxidação pela ADH apresenta-se saturado, devido à depleção de  $NAD^+$  (Lieber, 1997). Em consequência disso, o consumo crônico de álcool resulta em aumentos significativos não apenas do metabolismo do etanol, mas também na depuração de outros fármacos e que são eliminadas por sistemas de microsomas hepáticos, como os barbitúricos. Já para a CAT presentes nos peroxissomas, a biotransformação hepática peroxidativa do etanol é limitada pela produção endógena de peróxido de hidrogênio (Wallner & Olsen, 2008).

Em condições fisiológicas, a produção de  $H_2O_2$  é estimada, aproximadamente de 3,6 mmol/h/g de tecido hepático e responsável por menos de 2% da oxidação do etanol, entretanto o consumo do etanol induz a maior atividade de NADPH oxidase, contribuindo para maior

formação de  $H_2O_2$  (De Micinis & Brenner, 2008). Dessa forma, amplia-se a participação deste sistema na oxidação do etanol. Já a transformação do acetaldeído para acetato e acetil-coA é irreversível. O acetaldeído pode interagir com aminoácidos lisina, cisteína e serina, além da acetil-coA contribuir para a lipogênese e elevar seus níveis na circulação sanguínea de cetonas (Jordão Jr. et al 1998).

As intervenções farmacológicas para o alcoolismo ficaram restritas ao tratamento da síndrome de abstinência do álcool e ao uso de drogas aversivas (Castro & Baltieri, 2004). O primeiro fármaco desenvolvido foi o Dissulfiram, um inibidor irreversível e inespecífico de enzimas que decompõe o etanol no estágio de acetaldeído no organismo, levando a reação etanol-Dissulfiram e aos seus efeitos indesejáveis, típicos do fenômeno conhecido vulgarmente como “ressaca”. Neste contexto, outras intervenções farmacológicas, estas últimas baseadas no efeito anti-fissura são o Acamprosato e a Naltrexona. O primeiro inibe a atividade excitatória glutaminérgica, agindo, possivelmente, na subclasse dos receptores para glutamato (NMDA) como um co-agonista, especialmente quando há uma hipersensibilidade desses receptores, além disso, estimula a atividade gabaérgica por ação nos receptores GABA B. Já a Naltrexona é uma antagonista opióide utilizado como coadjuvante das intervenções psicossociais no tratamento ambulatorial do alcoolismo, sendo a primeira medicação aprovada pela FDA desde a introdução do Dissulfiram em 1995 (Castro & Baltieri, 2004).

**Figura 02:** Metabolismo oxidativo do álcool. A oxidação do álcool para o acetaldeído ocorre através das enzimas álcool desidrogenase (ADH), citocromo p450 2E1, ou pela catalase peroxissomal (em ordem de importância). O acetaldeído é oxidado para acetato pela enzima aldeído desidrogenase mitocondrial (ALDH). Produtos dessas vias metabólicas resultam em depleção celular de s-adenosilmetionina (SAME) e níveis elevados de homocisteína, acetaldeído e espécies reativas de oxigênio (EROs). Juntos, estes fatores causam uma resposta protéica descompensada sobre o retículo endoplasmático (RE), o chamado estresse do RE. Este estresse ativa as proteínas 1c e 2c de ligação ao elemento de regulação de esteróide (SREBP-1c e -2c), resultando em acúmulo de triglicerídeos. A quinase de AMPc (AMPK), uma chave reguladora do metabolismo, regula a oxidação de ácidos graxos (AG) e o seu transporte através do receptor alfa ativado de proliferador de peroxissoma (PPAR $\alpha$ ); suprime a SREBP-1c, diminuindo a lipogênese; e inibe a atividade da acetil-CoA carboxilase (ACC), que por sua vez, diminuem os níveis de malonil-CoA e da atividade da Carnitina palmitoil transferase I (CPT I) e aumenta a oxidação de ácidos graxos. A atividade da AMPK é inibida pelo álcool, estresse do RE, fator de necrose tumoral (TNF $\alpha$ ) e EROs. A adiponectina que também ativa a AMPK, também é suprimida pelo consumo crônico de álcool. Todas essas mudanças induzidas pelo efeito do consumo alcoólico acarretam danos ao metabolismo lipídico e ao desenvolvimento da esteatose. A síntese de proteínas é suprimida através do bloqueio na iniciação da cadeia peptídica. O passo chave afetado pelo álcool envolve a inabilidade de ciclagem entre formas ativas e inativas do complexo de fatores de iniciação de proteínas eucarióticas 2 e 2B (complexo eIF2.eIF2B), prevenindo a formação da pré-iniciação do complexo 43S. Entretanto, com a exposição crônica alcoólica, os defeitos se estendem para habilidade do complexo eIF4 para regular efetivamente a associação entre o complexo 43S e o trecho 5' do RNAm e formar o complexo de pré-iniciação 48S (pre-IC). Defeitos na via de síntese protéica parece ser resultado de uma possível desregulação entre a quinase e a fosfatase envolvida na fosforilação de fatores de iniciação selecionados. A desregulação de vias de sinalização ainda não está completamente elucidada. As linhas vermelhas tracejadas indicam inibição ou ativação de vias e as linhas verdes indicam estimulação ou ativação de vias.



Fonte: Molina, 2008.

### 3.3. Doença hepática alcoólica (DHA)

O fígado é um dos maiores órgãos do corpo e representa aproximadamente 2% do peso corporal total. Desenvolve-se como uma bolsa embrionária a partir do duodeno. Imprescindível para a sobrevivência do indivíduo, devido à multiplicidade de funções não-substituíveis ou não-compensada por outros(s) órgãos. É responsável pela desintoxicação e a metabolização no organismo. A função hepática restringe-se, essencialmente, a seu principal grupo de células parenquimais, os hepatócitos. Estes são razoavelmente vulneráveis a danos, porém possuem alta capacidade de regeneração. Funcionalmente, estas células participam da regulação do metabolismo intermediário, processos de desintoxicação de endo e xenobióticos, síntese e circulação de proteínas, lipídios e ácidos graxos (Malhi et al, 2010).

Outros grupos de células coexistentes no arcabouço hepático estão os colangiócitos, presentes nos ductos biliares, localizadas na zona porta; a estrutura vascular do órgão é constituída de vasos sinusóides fenestrados formados apenas por células endoteliais; outro tipo celular presente são as células de Ito ou histiócitos (célula pericítica sinusoidal), responsáveis pelo estoque de gordura que podem ser transformadas em miofibroblastos em situação de injúria e de doença. Ocorre também a presença de macrófagos residentes, as células de Kupffer, células *natural Killer* (NK) e células T *natural killer* (NKT), o que confere ao fígado uma função relevante e participativa no sistema imune inato (Baratta et al, 2009; Gao et al, 2008).

Como partícipe do sistema imune inato, o álcool atua com destaque em respostas de inflamação aguda, liberando a proteína C-reativa e a de ligação à manose, fatores do complemento, ferritina, proteína amilóide A e P, além de surfactante (Baumann & Gauldie, 1994; Gao et al, 2008). Neste contexto, o consumo maciço de xenobióticos contribui para a instalação de um processo inflamatório sistêmico, interferindo na defesa natural do hospedeiro contra influxo da microbiota intestinal e seus produtos (Wang et al, 2010). Os mecanismos e eventos da DHA foram discutidos, primeiramente na hipótese de “dois *hits*” ou “multi-*hits*”, proposta por Day & James (1998), em que o primeiro *hit* envolve o aparecimento da esteatose e na sequência, surge o segundo *hit*, a progressão para as outras complicações (esteatohepatite e fibrose/cirrose), neste estão contribuindo os estressores ambientais, tais como a hiperglicemia, hiperlipemia e mesmo a continuação do uso de xenobióticos (Begrache et al, 2006), e a própria lipotoxicidade causada pelo acúmulo de

triglicérides no fígado acarreta desregulação das vias do metabolismo lipossomal (Feldstein et al, 2004 e 2006).

O álcool é a maior causa de doença hepática em todo mundo, e comumente se associa à presença simultânea da doença hepática de origem não-alcoólica (obesidade) e/ou hepatite viral. Agravos decorrentes da ingestão acentuada representam a maior causa de morbidade e mortalidade em todo o mundo (WHO, 2007). Fatores de riscos responsáveis pelo surgimento, desenvolvimento e manutenção da história natural da doença alcoólica hepática ligam-se ao volume da dose, duração e ao tipo de bebida consumida, ao gênero, etnicidade e a outros fatores de riscos associados como os genéticos. O espectro da doença hepática alcoólica (ALD) é definido desde a presença da esteatose até a presença da cirrose. A doença pode manifestar-se em 90% dos indivíduos que consomem mais de 60 g/dia de álcool por um período igual ou superior a 10 anos, mas pode ocorrer em indivíduos que consomem menor quantidade (Crabb, 1999), para mulheres este valor cai para 20 g/dia (Bellentani et al, 1997).

O estabelecimento e o aparecimento das primeiras lesões observadas no tecido hepático são decorrentes, principalmente, da elevação exacerbada de espécies radicalares com alto poder de oxidação no meio celular. Estas são geradas na cadeia respiratória, pelo próprio metabolismo alcoólico pela via induzível da CYP2E1 dos hepatócitos e pela NADPH oxidase, principalmente nas células de Kupffer e infiltrado granulocítico (Cerderbaum, 2008).

As anormalidades funcionais e morfológicas da mitocôndria representam uma das primeiras manifestações da injúria nos hepatócitos em decorrência do hábito etílico, onde as primeiras alterações observadas na morfologia hepática é a presença inicial de formação de corpúsculos hialinos de Mallory, em que se demonstram alterações no arranjo de filamentos intermediários do citoesqueleto, especialmente em citoqueratina 8 e 18, o aparecimento de células balonizadas, porém o avanço da doença ou estabelecimento do estado esteatótico, com presença de pequenos vacúolos de gordura no parênquima, pode ser concomitante (Lackner et al, 2008).

Estudos para a avaliação dos efeitos crônicos e elevados do álcool se iniciaram na década 1950 tanto em humanos como em roedores (Kiessling & Pilström, 1966). E a partir dessa época, já se hipotetizavam alterações no balanço oxidativo *in vivo* pelas enzimas álcool e aldeído desidrogenases, e por alterações de mobilização de lipídios periféricos para o tecido hepático (Sozio & Crabb, 2008). Outros estudos mais recentes, colocam a mitocôndria como



uma das principais organelas afetadas pela exacerbação oxidativa, em que ocorre a diminuição dos níveis de glutatona mitocondrial (GSHmt) e sua capacidade de fosforilação oxidativa, aumentando o processo de peroxidação de sua bicamada lipídica e levando-a a disfunção mitocondrial (Manzo-Avalos & Saavendra-Molina, 2010). Estes eventos diminuem o tempo de vida mitocondrial e assim, contribuem para o aceleração do processo apoptótico celular (Bailey & Cunningham, 2002).

Outra participação de relevância na hepatotoxicidade causada pelo álcool é a resposta largamente modulada pelo sistema imune inato através da sinalização de citocinas pró-inflamatórias, fatores quimiotáticos de recrutamento de granulócitos para áreas de injúrias e aumento da permeabilidade vascular para proteínas e plasma, além das reações de antígenos originados de produtos da peroxidação lipídica com proteínas hepáticas e endotoxinas circulantes constituem uma ampla continuação de danos e progressão da DHA (Albano, 2008; Malhi et al, 2010).

Neste cenário, os achados morfológicos encontrados na esteatose vão desde uma presença mínima de vacúolos e de menor injúria à forma mais avançada severa na ALD, incluindo esteatohepatite, fibrose e cirrose, em que não se apresentam de forma homogênea nas populações que consome média elevada de consumo (Rehm et al, 2009). Aproximadamente 15% dos pacientes com diagnóstico estabelecido de cirrose desenvolve carcinoma hepatocelular (Yip & Burt, 2006) e entre os consumidores crônicos, 25% desenvolvem esteatohepatite e apenas 10% evoluem para cirrose (Bellentani et al, 1997; Day, 2006). Isto se torna claro em pesquisas experimentais em que diferentes linhagens de camundongos apresentam padrões diferenciados de susceptibilidade à formação de corpúsculos de Mallory, de injúria celular induzida pelo agente 3,5-dietoxicarbonil-1,4-diidrocolidina e diferentes padrões de achados histológicos foram encontrados nestas linhagens (Hanada et al, 2008).

O diagnóstico da esteatose é realizado quando a deposição de lipídios excede 5% dos hepatócitos, enquanto o envolvimento de mais de 50% é reconhecido e caracterizado como o fígado gorduroso (Tannapfel et al, 2011). Um processo concomitante e adicional que pode ocorrer é a inflamação, gerando o estado de esteatohepatite de origem alcoólica (ALD) ou não-alcoólica (NASH). A correlação clínico-patológica para o diagnóstico é caracterizado histologicamente por lesões que diferem da inflamação portal crônica e de fibrose das mais outras formas de doença hepática crônica.

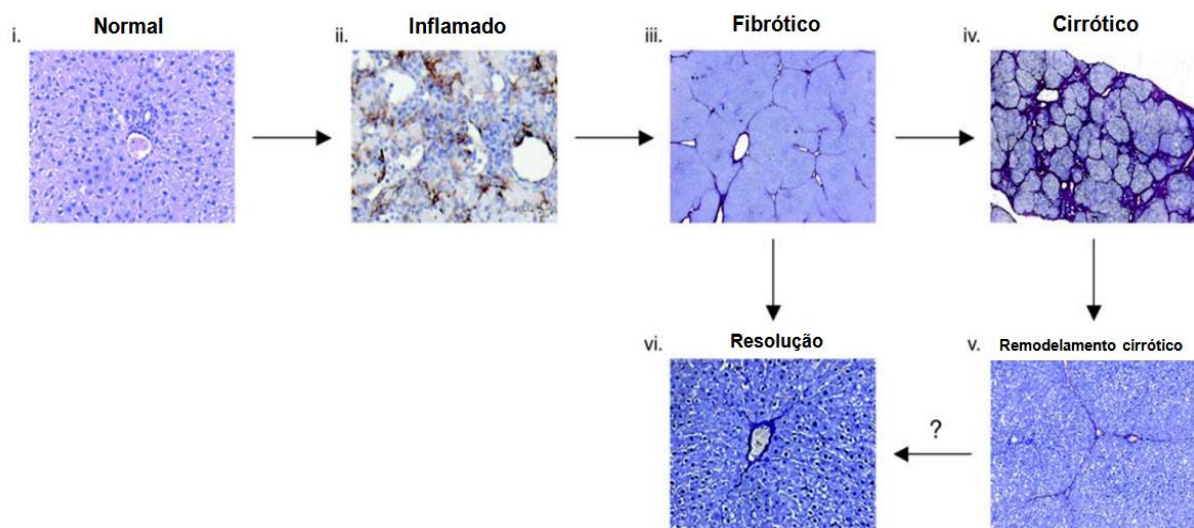
Achados morfológicos para esteatohepatite em pessoas adultas incluem a esteatose, uma leve ou crônica inflamação lobular, injúria celular manifestada pela degeneração em balão de hepatócitos, fibrose perisinusoidal, além de corpúsculos hialinos de Mallory em hepatócitos balonizados, núcleos glicogenados e lipogranulomas em tamanhos variados, e também a inflamação portal é tipicamente leve, caso esteja presente. No entanto, a presença de infiltrado inflamatório nos lóbulos hepáticos e injúria celular, como a manifestada pela degeneração celular (células em balão), especialmente localizados na zona 3 acinar, já sugerem o diagnóstico de esteatohepatite (Brunt et al, 2003) e pode se prolongar para o desenvolvimento de fibrose ou cirrose (Figura 03).

O acúmulo de lipídios no fígado resulta dos seguintes processos patogênicos: (1) de maior captação de ácidos graxos circulantes para evitar a lipotoxicidade de altos níveis séricos, (2) aumento da síntese de ácidos graxos no fígado (a partir da glicose ou acetato), (3) diminuição da  $\beta$ -oxidação e (4) diminuição da síntese ou secreção de lipoproteínas, especialmente a VLDL, principal caminho de eliminação de lipídeos hepáticos (Burt *et al*, 1998). Entretanto a esteatose sozinha ou seu estado puro é reversível e, em geral, indolente e não-progressiva, ao contrário, a esteatohepatite, com a descontinuação do uso e a total abstinência pode voltar ao estado de normalidade num período de 4 a 6 semanas (Crabb, 1999).

O diagnóstico específico da ALD é baseado na evidência do consumo alcoólico perigoso e na presença da doença hepática. A investigação é baseada em marcadores de lesão hepática; métodos clínicos eficazes para dedução de lesão hepática pelo álcool, porém não específicos para detectá-la quando avaliados separadamente. A investigação sérica das aminotransferases (AST, ALT e AST/ALT) é bastante útil para detectar alterações hepáticas. Níveis elevados destas aminotransferases de 2-6 vezes são sugestivos ao diagnóstico de hepatite alcoólica. Valores séricos  $> 500$  IU/L de AST e  $> 200$  IU/L de ALT são indicadores para processos de degeneração lipídica alcoólica e a razão  $>3$  é altamente sugestivo para o diagnóstico da ALD (Nyblom *et al*, 2004). Níveis séricos de  $\gamma$ -GT, volume corpuscular médio (VCM), além da medida de bilirrubina, transferrina, FAL e a combinação de outros são também indicados para avaliação do diagnóstico. Quanto este é realizado por imagem pode ser utilizado como alternativa a biópsia (método “padrão ouro”), utilizando-se o ultrassom e ressonância magnética nuclear pode-se obter sucesso para indicar esteatose (O’Shea et al, 2010).

Embora a abstinência e a descontinuação do uso de bebidas alcoólicas e xenobióticos, ou mesmo a perda de peso seja o recomendado para o tratamento. Vários agentes terapêuticos têm sido investigados, contudo, não se mostram com grande eficiência para o tratamento do espectro de doenças de origem hepática. Corticosteróides, Pentoxifilina, Propiltiouracila e fármacos anti-fator necrose tumoral alfa (anti-TNF- $\alpha$ ) têm sido usados em pacientes com hepatite alcoólica com certo sucesso. No entanto, não são vantajosas em relação ao tempo de administração (Tome & Lucey, 2004).

**Figura 03** - Dinâmica de cicatrização do tecido hepático. A cirrose hepática é um exemplo da dinâmica da cicatrização de um ferimento. Dano ao fígado normal (i) resulta em inflamação e ativação de histiócitos (ii); identificada por imunohistoquímica com marcação para  $\alpha$ -SMA (cor marrom) para colágeno fibrilar, culminando em fibrose (iii) por último, em cirrose (iv). Abstinência dos agentes de injúrias pode permitir o remodelamento da matriz fibrilar, levando a uma diminuição da cirrose (v). A resolução espontânea da fibrose depois remoção da causa da injúria, resulta retorno para a arquitetura próxima da normal (vi). Em caso da instalação completa do estado cirrótico, a resolução desse caso ainda não é conhecida.



Fonte: Retirada e adaptada de Iredele, 2007.

### 3.4. Hipertensão secundária ao álcool

Entre os diversos problemas de saúde relacionados ao álcool, a hipertensão é um achado bem comum entre os bebedores crônicos. Relaciona-se intimamente ao consumo exagerado e apresenta-se como variável independente que atua na pressão arterial com magnitude similar ao da obesidade (Klatsky, 1995). Outras condições cardiovasculares relacionadas ao seu consumo estão os acidentes vasculares cerebrais isquêmicos e

hemorrágicos, bem como as arritmias cardíacas. Em contraste, o efeito vasodilatador conduziu o etanol ao *status* de medicamento no século XVIII, quando seu uso foi recomendado para tratamento da *angina pectoris* (Heberden, 1786). Entretanto, o desenvolvimento de uma hipertensão secundária ao seu consumo parecia improvável naquele momento. O primeiro trabalho a descrever a hipertensão induzida pelo etanol foi publicado em 1913 por Lian, em que se descreveu a elevação da pressão arterial sistólica em soldados presentes na primeira guerra mundial.

Hoje, sabe-se que os principais mecanismos envolvendo o consumo etílico e a hipertensão envolve uma resposta simpática exacerbada (Randin et al, 1995), a secreção elevada de glicocorticóides e neurotransmissores, o aumento da captação  $\text{Ca}^{+2}$  livres com alterações da resposta contrátil do músculo liso e a deficiência de  $\text{Mg}^{+2}$ , com consequente aumento da resistência vascular periférica (Maiorano et al, 1999; Chakraborti et al, 2002). Além disso, o estresse oxidativo, através do aumento acentuado do  $\bullet\text{O}_2^-$ , e por conseguinte, a diminuição da biodisponibilidade de  $\bullet\text{NO}$ , promove a disfunção endotelial e a hipertrofia de células vasculares (Zalba et al, 2001). Assim, a hipertensão arterial secundária, diferentemente da hipertensão primária, é provocada por substâncias que induzem a elevação pressórica e/ ou ao agravamento de uma hipertensão arterial preexistente, provocando também redução da eficácia de medicamentos anti-hipertensivos e decorrentes de diversas causas secundárias, entre as mais comuns, provocadas por uso contínuo de fármacos e/ou de substâncias, tais como: anticoncepcionais, antiinflamatórios não-esteróides e esteróides, reposição de hormônios tireoidianos, terapias imunossupressoras, agentes anestésicos, antidepressivos inibidores da monoamina-oxidase e os simpaticomiméticos (Plavnik, 2002).

As propriedades aterogênicas e não-aterogênicas dose-dependentes do etanol podem constituir o principal mecanismo patofisiológico de interação entre a ingestão alcoólica e as doenças cardiovasculares (Novelli, 2005). Contudo, a literatura atual ainda se mostra carente acerca desse relevante tópico. Contudo, alguns modelos de roedores se mostram efetivos para busca de respostas cardiovasculares e metabólicas em estudos de interação de dietas e consumo alcoólico. Emeson et al (1995) descrevem que somente o uso do álcool etílico 0,3-6% associado a dieta líquida dislipidêmica e aterogênese, promove efeito de redução de formação de placas aterogênicas, mesmo em contraposição aos baixos níveis de HDLc séricos. Este estudo foi realizado com fêmeas de camundongos da linhagem C57BL/6 sob

intervenção dietética etílica de 22 semanas. Esse modelo demonstra o efeito anti-aterogênico do etanol não está relacionado à elevação de lipoproteínas de alta densidade.

Em humanos, Jensen et al (2006) realizou estudos com voluntários saudáveis que consumiram uma taça de vinho tinto diariamente por três semanas. Observaram uma diminuição tanto na viscosidade sanguínea como na concentração sérica de fibrinogênio e que estes efeitos se prolongaram por mais três semanas após a abstinência. Em contraste, Veestra et al (1990) demonstraram o efeito agudo de uma única vez de três taças de vinho tinto no jantar, que provoca efeito imediato em elevar os níveis de HDLc em 11,5% e 7,3% de apoproteína A<sub>2</sub>. Neste cenário, outros trabalhos mostram que o consumo alcoólico tem sido associado com o aumento da fibrinólise, diminuição da agregação plaquetária e coagulação sanguínea (Rimm et al, 1999; Renaud & Lorgeril, 1992; Lorgeril & Salen, 1999).

Di Castelnuovo et al (2006) descrevem, em estudo de meta-análise envolvendo 34 estudos de seguimento com homens e mulheres e uma amostra de 1.015.835 sujeitos, respectivamente, sendo observados no decorrer do estudo 94.534 mortes. Nesta meta-análise, apresentam-se as curvas características da relação consumo de bebidas alcoólicas e mortalidade. Os autores apresentam curvas gráficas em forma de “J” que indicam uma redução inicial da mortalidade para valores de baixo consumo e com a continuação, ocorre elevação da curva até um platô, o que se demonstra a elevação da mortalidade. Concluindo-se que, o consumo de 2 a 4 drinques por dia para homens e 1 a 2 drinques por dia para mulheres foi inversamente associado, ao menos, com menor índice de mortalidade, e a mínima ingestão, aproximadamente de 6g/dia (metade do teor alcoólico de um drinque) promoveu maior sobrevivência tanto para homens quanto para mulheres.

Atualmente, vários estudos demonstram que a baixa alcoolemia e a manutenção de seu uso promovem aumento no fluxo coronariano, do débito cardíaco e do volume sistólico, porém o abuso alcoólico é o maior fator de risco para a chamada síndrome cardíaca do feriado (*Holiday heart syndrome*) em que existe um aumento no risco de taquiarritmias supraventriculares, aumento do peso cardíaco e acidentes vasculares cerebrais (Neaton et al, 1995). Seguindo essa lógica, os efeitos benéficos estão relacionados, não só a substância álcool, mas também a outras substâncias presentes nas bebidas alcoólicas, a exemplo dos flavonóides, e peculiaridades de cada indivíduo, como predisposição gênica aos efeitos tanto positivos quanto os prejudiciais.

### 3.5. Complexo enzimático NADPH oxidase e Inibidores

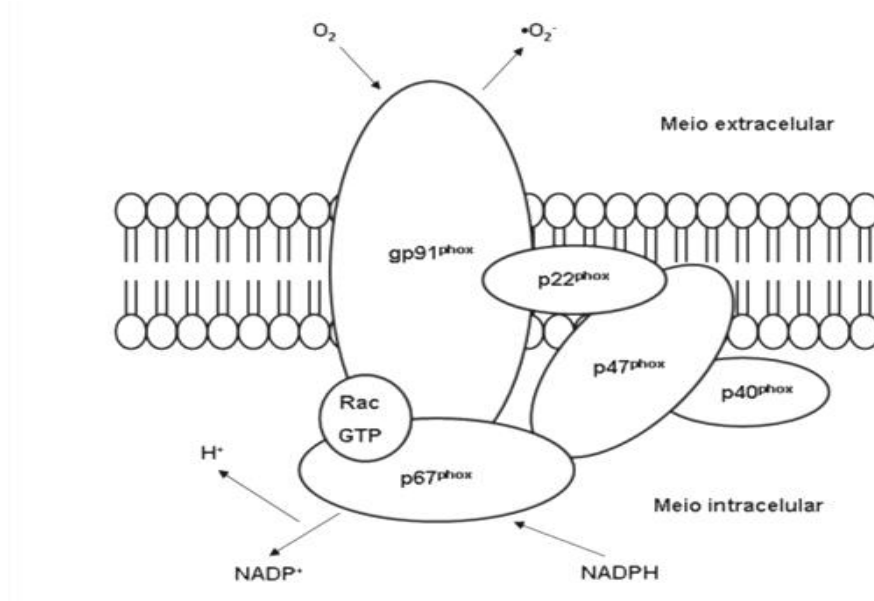
As NADPHoxs são um grupo de enzimas associadas à membrana plasmática encontradas em uma grande variedade de células de origem mesodérmica. A primeira descrição de sua atividade foi realizada por Sbarra & Karnovsky (1959) em fagócitos polimorfonucleares. Esse grupo de enzimas é caracterizado por ser um complexo multienzimático de heme proteína, composta por subunidades citossólicas e transmembranares. Os componentes desse sistema enzimático são subunidades protéicas transmembranares, a p22phox e p91phox, também chamada de Nox2, juntas estas compõem o citocromo b<sub>558</sub>, presentes nas membranas de vesículas secretórias e grânulos específicos, onde ocorrem como flavoemeproteínas heterodiméricas; e pelas subunidades citossólicas compostas pelas subunidades p47phox, p67phox e a p40phox, e a GTPase, a rac1 (presentes em macrófagos de camundongos) ou rac2 (Figura 04) (Babior, 1999).

A ativação da NADPHox envolve a translocação do componente citossólico p47phox, ativado por fosforilação através da proteína quinase C (PKC) para o Nox2 na membrana. Esse acoplamento oxidativo é capaz de transferir elétrons do NADH ou NADPH para o O<sub>2</sub> através de um grupo heme e forma o ânion radical superóxido ( $\bullet\text{O}_2^-$ ). Além da translocação da subunidade p47phox, a ativação depende também das racs. Estas são proteínas G de baixo peso molecular, e permanecem inativas quando ligadas ao inibidor de dissociação, o nucleotídeo guanina. As NADPHoxs em células fagocíticas podem ser induzidas por um grande número de partículas e agentes solúveis que permite a ativação das racs (Hougge *et al*, 2006) e podem ser reguladas por fatores humorais, citocinas (TNF $\alpha$ , TGF $\beta$ , TDGF, IL-6, IL-10, IL-1 $\beta$ , CTLA-4 e TAP2 ) angiotensina II, trombina ou por distúrbios no fluxo sanguíneo, além da contribuição de fatores genéticos (Griendling, 2000; Bataller & Brenner, 2005).

Existem ao menos cinco variações dos Nox (**N**onphagocytic NADPH **o**xidase) [Nox1, Nox2, Nox3, Nox4, Nox5, Duox1 e o Duox2 (**D**ual **o**xidase)] diferenciadas apenas pela presença das subunidades presentes no complexo, expressos em um pequeno número de tecidos, porém em alta densidade (Babior, 1999). Os Nox1 e Nox4 são altamente expressos no endotélio e músculo liso vascular (Nox4 é predominante, enquanto o Nox 1 quase não é detectado) (Ellmark *et al*, 2005) no entanto, o Nox1 é largamente expresso em células epiteliais do cólon e o Nox4, nos rins. O Nox2, também conhecido como p91phox, está presente principalmente em células fagocíticas, mas são expressos em menor quantidade nos

hepatócitos, músculo esquelético e liso, endotélio e células hemopoiéticas; Nox3 no canal auditivo, Nox5 nos tecidos linfáticos e testículo e o Duox1 e Duox2 na tireóide (Berdard & Krause, 2007).

**Figura 04** - Estrutura da NADPH oxidase fagocítica. A gp91phox é o ligante da NADPH com função transportadora de elétrons na NADPH oxidase ativa. A produção de  $\cdot\text{O}_2^-$  extracelular ocorre pela redução de um elétron do  $\text{O}_2$  via gp91phox, usando  $\beta$ -nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH).



Fonte: Rabêlo et al, 2010.

Em funções biologicamente reguladas, o  $\cdot\text{O}_2^-$  e outras espécies reativas de oxigênio (EROs) formadas através do complexo NADPHox, participam do controle respiratório, da produção da eritropoetina e das funções hipóxi-induzíveis, do relaxamento do músculo liso, além de modular e acentuar cascatas de sinalização em processos imunológicos através da principal espécie produzida. Esse ânion-radical é formado a partir redução univalente da forma molecular do oxigênio triplete ( $^3\text{O}_2$ ) ou pela redução parcial do oxigênio molecular. No entanto, durante processos inflamatórios agudos ou crônicos ocorrem a produção excessiva de  $\cdot\text{O}_2^-$ , que contribuem para elevar a injúria e dano tecidual (Salvemini, Ischiropoulos & Cuzzocrea, 2003). Contribuem também para elevação de EROs, apesar da maior fonte ser de origem NADPHox, a ativação das vias da xantina oxidase, a ciclo-oxigenase, a NO sintetase ou mesmo, ocorre a participação de componentes não-enzimáticos reativos, como a semi-ubiquinona e cadeia transportadora de elétrons através de desacoplamento oxidativo (Dröge, 2002)

Vários estudos demonstram que a atividade da NADPH oxidase pode ser inibida por ação de fármacos (Stefanska & Pawliczak, 2008). O bloqueio deste complexo por produtos de ocorrência natural é efetivamente realizado pela apocinina (4-hidróxi-3-metóxi-acetofenona). Ou mesmo, a partir de extratos de plantas que contenham este princípio ativo, também conhecido como acetovanilona, um fitoquímico bastante explorado em pesquisas como inibidor seletivo do complexo multienzimático NADPH em modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*. Outros estudos, descrevem atividade da apocinina na inibição do complexo NADPHox em células fagocíticas e não-fagocíticas (Lafeber et al, 1999; Zhang et al, 2005). Esta substância possui elevado potencial antioxidante (Heumüller et al, 2008; Castor, Locatelli & Ximenes, 2010), ação antiinflamatória através da inibição de citocinas inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, além de inibir a transcrição de fatores redox-sensíveis, tais como NF- $\kappa$ B e AP-1 (Kim et al, 2011) e etc (Tabela 01).



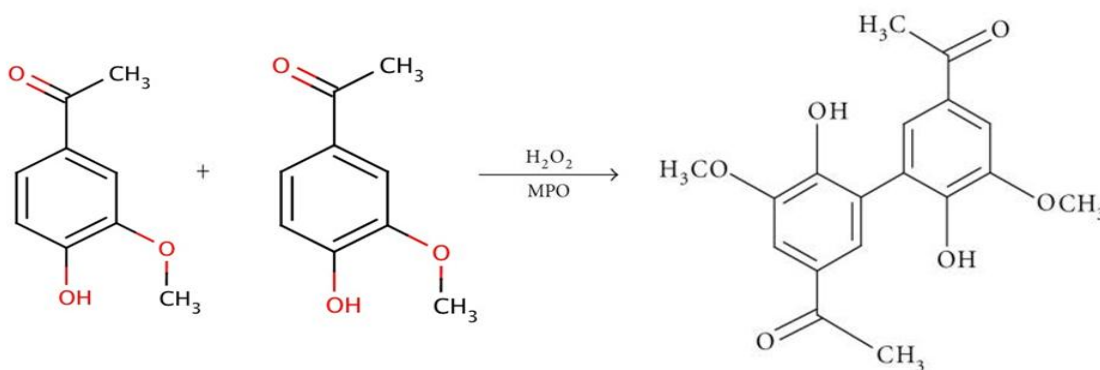
**Tabela 01 – Efeitos da Apocinina *in vitro* e *in vivo***

Modelo		Efeitos	Referência
<b><i>In vitro</i></b>			
Células endoteliais estimuladas por Fosfolipase A2.	600 µM	Inibição da NADPHox e redução de EROs.	Holland et al, 1998.
Células de cartilagem humana para estudo da artrite reumatóide.	30 µg/mL	Ação antiinflamatória em cultura de cartilagem articular.	Lafeber et al, 1999.
Macrófagos J774A.1 estimuladas por INFγ/LPS.		Inibiu a formação ·O <sub>2</sub> · e ONOO·	Muijsers <i>et al</i> , 2000.
Ratos Wistar-kyoto e Ratos hipertensos (SHRSP) e vasos de humanos.	0,1 - 1,0 mmol/L	Diminuição de ânion radical superóxido de origem NADPH oxidase, aumento da biodisponibilidade de NO, melhora da vasodilatação.	Hamilton et al, 2002.
Células gliais N11	3 - 1200 µmol	Elevou níveis de MDA e H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , diminui GSH/GSSG e elevou níveis de LDH (citotóxica).	Riganti et al, 2006.
Células HEK293(expressa altos níveis dos Nox1, Nox2 e Nox4) e células endoteliais e musculares vasculares.	10 µmol - 1,0 mmol	Sem efeito em células HEK293 e antioxidante em células endoteliais e musculares lisas.	Heumeller et al, 2008.
Tecido adiposo periadventício obtido de C57BL/6 obesos induzidos por dieta hiperlipídica.	1 mmol/L	Redução de EROs estimulada pela Angiotensina II.	Ketonen <i>et al</i> , 2010.
<b><i>In vivo</i></b>			
Modelo animal de artrite	Água de beber	Redução do processo de inflamação.	Hart et al, 1990.
Modelo de Isquemia e Reperfusão mesentérica em camundongos C57BL/6.	1,2 mg/mL	Sem efeito.	Yamaguchi et al, 2003.
Modelo de Isquemia e reperfusão pulmonar em porcos.	200 - 400 mg/kg Água de beber	Aumento da permeabilidade e diminuição de EROs vascular.	Dodd-o et al, 2004.
Rato Sprague-Dawley.	1,5 mmol/L Água de beber	Inibidor seletivo do complexo NADPH oxidase em células fagocíticas e não-fagocíticas.	Zhang et al, 2005.
Modelo de camundongos BALB/c induzidos à inflamação por Zimosan.	14 mg/kg	Diminuição da síntese de proteoglicanos e da inflamação.	Hougee et al. 2006.
Modelo de hemorragia intracerebral induzido por injeção de collagenase em ratos Sprague-Dawley.	3 - 30 mg/kg	Sem efeito.	Titova et al, 2007.
Modelo murino de Isquemia e reperfusão cerebral (AVC), utilizando camundongos machos C57BL/6.	2,5 - 5 mg/kg (i.v.)	Melhora da função neurológica e aumento da sobrevida em dose 2,5 mg/kg, em doses maiores, aumentou hemorragia cerebral e mortalidade.	Tang et al, 2008.
Modelo de ratos Sprague-Dawley diabéticos por estreptozotocina.	15 mg/kg Gavage	Previne a formação de produtos finais glicados em ratos diabéticos.	Thallas-Bonke et al, 2008.
Modelo de Isquemia e Reperfusão hepática com camundongos ICR.	3 mg/kg	Reduziu lesões ocasionada por EROs no fígado.	Liu et al, 2008.
Ratos Hipertensos (SHRs)	50, 100 e 150 mg/kg (v.o e i.v.)	Não reduziu a PAS e PAD, porém inibiu a NADPHox em granulócitos.	Schlüter et al, 2008.
Modelos de camundongos hAPP(751) <sub>SL</sub> para o Alzheimer.	10 mg/kg Gavage	Diminui tamanho das placas β-amilóide, aumento da micróglia e diminuição da inflamação.	Lull et al, 2011.

A apocinina se caracteriza por ser um agente oral ativo com odor de baunilha. Apresenta baixa toxicidade em dose oral [DL<sub>50</sub>: 9 g/kg] (Van den Worm et al, 1996) e IC<sub>50</sub> ~ 10 µg em fagócitos (Simons et al, 1990). Apesar de sua eficácia, não é um inibidor totalmente específico, pois interfere com o metabolismo do ácido aracdônico, esta molécula possui características altamente exploradas (Engels et al, 1992).

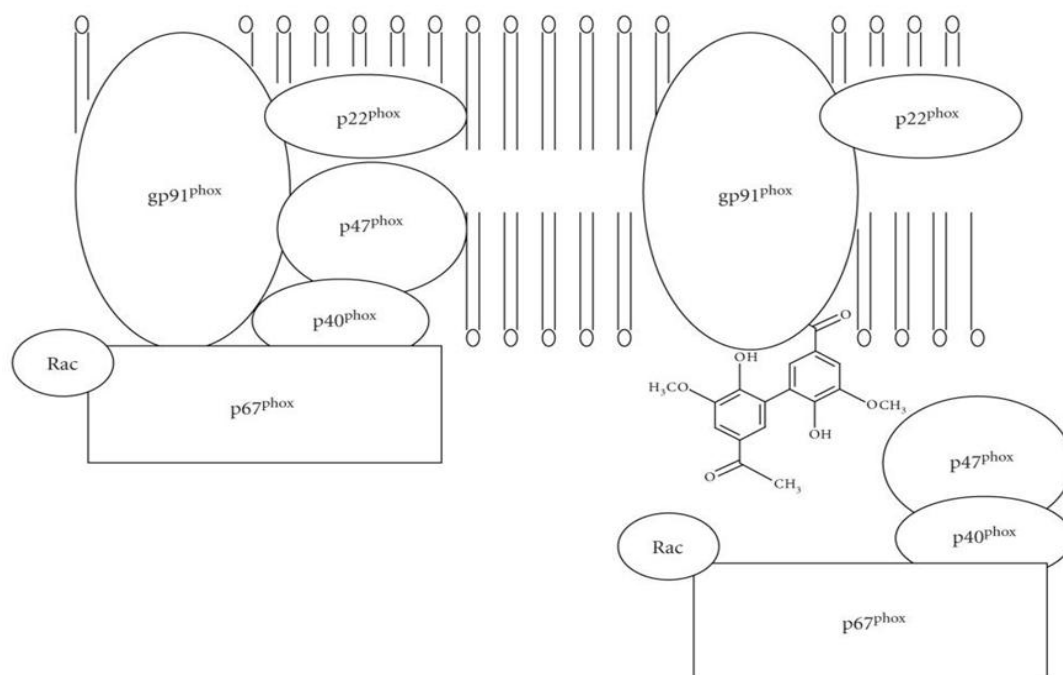
Historicamente, Oswald Schmiedeberg em 1883, foi o primeiro a descrever efeitos do uso de extrato obtido da raiz da planta *Apocynun cannabinum* para o tratamento de doenças cardíacas e tratamento edemas (revisado por Stefanska & Pawliczak, 2008). Em 1971, a substância foi isolada da raiz *Picrorhiza kurroa* (Scrophulariaceae) e foi descrita possuir atividade imunomodulatória (revisado por Stefanska & Pawliczak, 2008). Como componente fenólico foi identificada também com características altamente prooxidantes. Sua atuação como inibidor do complexo NADPH, e por consequência, inibidor das espécies reativas de oxigênio, deve-se supostamente à sua ação na forma radicalar e na formação de dímeros (diapocinina) e trímeros (triapocinina) derivados durante sua oxidação e posterior geração de radicais (Figura 05 e 06). De maneira indireta, promove a elevação de radicais livres e NADP,<sup>+</sup> e diminui a razão glutaciona reduzida/glutaciona oxidada (GSH/GSSG), dependente da presença da mieloperoxidase (MPO) ativada e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, responsável pela oxidação de tióis (Castor, Locatelli & Ximenes, 2010).

**Figura 05** - Formação de dímeros de apocinina. Retirado de Stefanska & Pawliczak, 2008.



Fonte: Stefanska & Pawliczak, 2008.

**Figura 06** - Mecanismo de inibição da NADPH oxidase pela apocinina.



Fonte: Stefanska & Pawliczak, 2008.

Muito se questionou a respeito da eficácia da apocinina em inibir a atividade da NADPH oxidase em células não fagocíticas. Em trabalho realizado por Kanegae et al (2010) foi testado a ação da apocinina e do dímero de apocinina (diapocinina) em células mononucleares de sangue periférico humano (PBMC), observou-se que o diapocinina inibiu fortemente a expressão da subunidade p91<sup>phox</sup>, enquanto a apocinina provocou o mesmo efeito apenas em altas doses. Ademais, a diapocinina também inibiu a produção de IL-10 e TNF- $\alpha$  em resposta a lipopolissacarídeo (LPS) em modelo *in vitro*, enquanto a apocinina na sua forma simples molecular não teve efeito sobre os parâmetros anteriormente analisados.

A utilização de flavonóides e polifenóis em dietas apresentam-se benéfica à saúde. Da mesma forma que a apocinina, estas substâncias apresentam grande capacidade de diminuir o acúmulo de radicais livres, atuando como *scavenging* em meios *in vitro*, e em particular, o consumo dietético de flavonóides catecóis, favorece a melhora da função endotelial vascular através da melhor bioatividade e biodisponibilidade do óxido nítrico em vasos arteriais *in vivo*, e protegendo esse sistema contra doenças (Manach & Donovan, 2004), e, além disso, a relevância terapêutica com diferentes polifenóis exibe interação com vias do  $\bullet$ NO, promovendo efeito vasodilatador, diminuindo a pressão arterial e expressão gênica, e

consequentemente, protegendo o sistema cardiovascular (Pechánová et al, 2006). No entanto, o uso de alimentos ricos em polifenóis ou suplementos não correspondem à mesma ação observada *in vitro*. A ação *ex vivo* e *in vivo* são discretas ou mesmo ausentes, isso parece ocorrer, em parte, devido a formação de outros metabólitos no processo digestivo. Como o transporte de polifenóis na circulação sanguínea ocorre através de conjugados glucoronídeos e sulfatos, assim pode-se observar a diminuição e perda da capacidade de sequestrar elétrons do fármaco.

Alguns tipos de flavonóides, as epicatequinas, foram descritas como sequestradores de ânion radical superóxido, porém não se mostrou capaz de inibir o complexo NADPH oxidase vascular em células endoteliais de veia de cordão umbilical humano (HUVEC) em cultura, porém dímeros procianidina B2 e o glucoronídeo de epicatequina formados foram efetivos em inibir a ação da NADPH oxidase e atuar na inibição de  $\cdot\text{O}_2^-$  (Taubert et al, 2004).

Em trabalho realizado por Steffen et al (2008) foi demonstrado a relação da estrutura-atividade de 45 substâncias sobre a capacidade de inibição direta da NADPH oxidase e de ação *scavenging* por flavonóides e outros fenóis em lisado de HUVEC, categorizando as substâncias em 4 grupos: flavonóides contendo anéis B catecóis não-substituídos (epicatequinas, catequinas, quercitina, luteolina, fisetina) não possuindo a capacidade de inibir o complexo NADPH oxidase, porém atuam como sequestradores de ânions radicais superóxido; catecóis *O*-metilados ou a ausência do grupamento hidroxila, ou sua adição promove a função de inibição da NADPH oxidase; a hidrogenação dos carbonos C2 e C3 do anel C reforça a potência de inibição da NADPH oxidase, e por último, a presença do arranjo vicinal do grupo hidróxi-metóxi no anel aromático acentua a capacidade de inibição. Isto pode explicar a atividade da apocinina e dímeros de apocinina, além de outros flavonóides serem similares.

O balanço redox em sistemas biológicos está associado à soma de produtos do potencial de redução e da capacidade redutora de uma série de pares redox, aclopados e mudanças neste equilíbrio induz ao estresse oxidativo (Vasconcelos et al, 2007) e os radicais livres são caracterizados por possuir alta capacidade de iniciar ou exarcebar uma reação ou processo oxidativo deletérico por uma via ou mais diferentes mecanismos. Substâncias antioxidantes e prooxidantes são consideradas como tais, de acordo, com seu potencial de oxidação (Simié et al, 2007). Substâncias com potencial de oxidação menor que 45 V são consideradas antioxidantes, valores maiores que esse potencial, são caracterizadas como

prooxidantes. O radical apocinina apresenta-se como um autêntico exemplo de um componente fenólico e exacerba características pro-oxidantes (Castor et al, 2010).

Além da apocinina e polifenóis, outros inibidores farmacológicos peptídicos e não-peptídicos bloqueiam a atividade catalítica do complexo NADPHox e/ou atuam como *scavengers*. São vastamente descritos na literatura, especialmente em pesquisas com aplicações terapêuticas para doenças cardiovasculares (Cifuentes & Pagano, 2006). O mais utilizado é sem dúvida o Difenileneidônio, também conhecido pela sigla inglesa, DPI (*Iodonium-derivative diphenylene iodonium*). Caracterizado em neutrófilos, este interfere na abstração um elétron a partir de um centro redox reduzido de NADPHox para formar um radical que então forma adutos com o cofator flavina (FAD) e resulta no desvio do elétron para o oxigênio molecular (O'Donnell et al, 1993). Como um inibidor não-específico, interfere com outros transportadores de elétrons como na atividade das enzimas óxido nítrico sintetase, xantina oxidase, do complexo mitocondrial I e o citocromo p450 redutase (Berdard & Krause, 2007).

Inibidores peptídicos são apresentados nas pesquisas com sucesso. O mecanismo de ação desses inibidores está associado à interferência da ligação às subunidades de ligação ao citocromo b558. O **Gp91ds-tat**, um inibidor específico do Nox2 e mimético, consistindo de uma pequena sequência de nove aminoácidos do gp91phox que normalmente se liga a subunidade p47phox e permite a permeabilidade celular, impedindo a interação com as proteínas do Nox. No entanto, é um inibidor de menor efetividade, a produção das EROs em neutrófilos é reduzida apenas ~25% em 50 mM e seu uso se limita a administração parenteral (Jacobson et al, 2003); o **PR39** é uma sequência peptídica de 39 aminoácidos de prolina e arginina, originalmente isolado do intestino de porcos e identificado em grânulos azurófilos de neutrófilos e macrófagos. Em neutrófilos, inibe a atividade da NADPHox por ligação ao domínio homólogo Src 3 (domínio SH3) da subunidade p47phox, portanto bloqueando a interação com o elemento da membrana p22phox. Também atua em células não fagocíticas, inibindo o Nox. Entretanto, apresenta-se como um inibidor não-específico, pois exerce outras propriedades relacionadas a domínio SH3, assim como gp91ds-tat, a administração não pode ser oral (Shi et al, 1996). O 4-(2-Aminoetil)benzenosulfonilflorida (**AEBSF**) é um inibidor de protease serina que inibe também o Nox por interferência na subunidade p47phox; 6,8-dimetil-5,7-hidroxi 2-(2-etil-3-hidróxi-4-metoxifenil)1-H benzo(b)piran-4-ona (**S17834**), um derivado flavonóide que vem sendo descrito possui características *scavengings*, no entanto seu

mecanismo de ação ainda não foi descrito; o **LY333531** atua como inibidor seletivo da PKC, além de outros inibidores desta enzima (Mollnau et al, 2002); **VAS3947**, um derivado de pirimidina e entre todos os fármacos aparece como o mais específico e mostra o melhor resultado em comparação a todos os outros fármacos inibidores do Nox (Wind et al, 2010).

Reações de nitração e nitrozilação podem levar a inibição da NADPHox, assim como bloqueadores sulfidrilas. O 4-hidroxinonal, o maior produto da peroxidação de membranas, inibe a NADPH com um IC<sub>50</sub> de 19 µmol/L, através do bloqueio de grupamentos tióis (-SH) (Babior, 1999). Além desses, o óxido nítrico ( $\bullet$ NO), nitrosotióis (RSNO), a grelina, 17β-estradiol e as maiores três classes de medicamentos para o sistema cardiovascular, as estatinas, inibidores da hidroxil-3-metil-glutaril-CoA redutase (HMG-CoA), inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) e antagonistas para o receptor AT<sub>1</sub>, indiretamente atuam na supressão da NADPHox vascular (Dusting, Salemidis & Jiang, 2005; Guzik & Harrison, 2006).

### **3.6. Modelos animais para dietas alcoólicas**

Na década de 1940, tomou-se conhecimento que roedores voluntariamente podem consumir álcool em experimentos de laboratório (Richter & Campbell, 1940). Observações a respeito desse tema colocam ratos e camundongos como ideais para isso (Besancon, 1993) e o uso de modelos animais têm contribuído enormemente para a compreensão dos distúrbios provocados pelo consumo de bebidas alcoólicas. Entre os modelos mais desenvolvidos estão os para estudo dos distúrbios relativo ao espectro de doenças hepáticas e distúrbios de comportamento. Modelos para o estudo do espectro de doenças hepáticas de origem alcoólica são desenvolvidos, especialmente para o avaliar a severidade da injúria provocada pelo consumo, estado nutricional, hipóxia, apnéia do sono e o tabagismo, além da regulação gênica e mecanismos bioquímicos envolvidos (Nanji & French, 2003).

As formas mais comuns de indução à intoxicação aguda e/ou crônica pela ingestão do etanol nesses modelos animais envolvem os modelos de ingestão intragástrica por gavage, de consumo forçado espontâneo e de injeção intraperitoneal. Em estudos para os efeitos agudos, o fígado é usualmente examinado poucas horas depois e a concentração de álcool

nestes animais variam ~250 – 450 mg/dL, similar às concentrações observadas em humanos logo depois de consumir bebidas alcoólicas (Hall et al, 2001).

Em geral, apresenta-se em estudos para os efeitos crônicos com variações para dois modelos animais, um modelo para dieta totalmente líquida de etanol *ad libitum* ou de infusão intragástrica, ou de um modelo para uma fusão de dieta líquida e sólida, onde o etanol é suplementado na água de beber com a dieta sólida através de ração comercial ou através de ração *ad libitum* suplementada com ágar contendo etanol a uma concentração de 30–40% de etanol (Bautista, 1997). Neste caso, a alcoolemia varia de 50 – 150 mg/dL, um valor que provoca alteração da locomoção em humanos. As dietas líquidas e a mistura de dietas líquida e sólida podem rapidamente desenvolver a esteatose (Lieber & DeCarli, 1982). Os animais-controle para esses experimentos são baseados e colocados nos experimentos para equivaler ao consumo nutricional e calorias da dieta alcoólica.

Alguns experimentos são questionáveis, de acordo com o modelo de animal utilizado. O C57BL/6 é pontuado desenvolver alta preferência pelo álcool, mas parece não desenvolver comportamento para o vício. O que implica a não desenvolver descontrole sobre o consumo de bebidas alcoólicas, ou seja, esses animais não seria um modelo ideal para a pesquisa do vício. No entanto, esse modelo é largamente descrito na literatura para estudos de efeitos metabólicos e cardiovasculares do álcool e se apresenta como um modelo favorável nesses estudos (Spanagel, 2000). Entretanto, devido à aversão natural ao etanol e bebidas alcoólicas comuns aos roedores, estudos preferem oferecer baixos volumes de álcool misturados ao sabor doce. Então, ratos e camundongos tendem a beber mais álcool do que água, com exceção da linhagem de ratos que naturalmente preferem álcool, os ratos P (McBride & Li, 1998).

## **4. MATERIAIS & MÉTODOS**

### **4.1. Materiais**

#### 4.1.1. Animais

Os animais utilizados neste estudo foram camundongos C57BL/6 machos com idade variando entre 12 e 20 semanas, provenientes do biotério central da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), alojados em gaiolas coletivas (30x19x13 cm) no Laboratório de Experimentação para camundongos C57BL/6 do Laboratório de Reatividade Cardiovascular, Setor de Fisiologia e Farmacologia, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Alagoas. Durante todo o período experimental foram mantidos sob condições padrão de experimentação animal (ciclo de iluminação automatizado de claro/escuro de 12 horas, com luzes acesas às 7 horas e desligadas às 19 horas, manutenção da temperatura ambiente a  $23 \pm 2$  °C e fornecimento de ração e água à vontade).

Todos os procedimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Alagoas (CEP/UFAL), sob o processo nº 009431/2009-29 (anexo I).

#### 4.1.2. Lista de Soluções & Reagentes

#### 4.1.3. Soluções

##### 4.1.3.1. Solução corante de Azul de anilina-acética

Composição: 5 g de azul de anilina, 8 mL de ácido acético PA e 200 mL água destilada.

##### 4.1.3.2. Solução corante de Fucsina ácida - escarlata de Biebrich

Composição: 10 mL de solução aquosa a 1% de fucsina ácida e solução aquosa a 1% de escarlata de biebrich e ácido acético.



#### 4.1.3.3. Solução Corante de Hematoxilina de Harris

Composição: 5 g de hematoxilina, sulfato de alumínio e amônio, 50 mL de EtOH 95%, óxido de mercúrio vermelho, 40 mL de ácido acético PA e 1 L de água destilada.

#### 4.1.3.4. Solução Corante Hematoxilina férrica de Weigert

Composição - Solução A: 1 g de Hematoxilina e 100 mL de EtOH PA; solução B: 4 mL de cloreto férrico a 30%, 1 mL de ácido clorídrico (HCl) e 100 mL de água destilada.

#### 4.1.3.5. Solução salina 0,9%

Composição para 1 L: 9 g de NaCl em 1 L de solução de água.

#### 4.1.3.6. Solução Tampão fosfato (0,1 M)

Composição para 1 L: 1 g de cloreto de sódio (NaCl), 0,2 g de cloreto de potássio (KCl), 1,44 g de hidrogenofosfato dissódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), 0,24 g de diidrogenofosfato de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ).

#### 4.1.3.7. Solução Tampão de Lise (RIPA)

Composição: 150 mM de NaCl, Triton X-100, 0,5% do deoxicolato de sódio, 0,1% do dodecil sulfato de sódio (SDS), 50 mM Tris e coquetel de inibidores de proteases, Ortovanadato de sódio, pH 8,0.

#### 4.1.3.8. Procedência dos Reagentes & Substâncias

Dr. Oetker<sup>®</sup> - Essência aromatizante sabor morango;

LabTest<sup>®</sup> - “Kits” colorimétricos de Albumina sérica, Alanina aminotransferase e Aspartato aminotransferase, Colesterol total, Fosfatase alcalina, Lactato desidrogenase e Triglicerídeos;

Merck<sup>®</sup> - Peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e azul de anilina;

Sigma-Aldrich<sup>®</sup> - Ácido tiobarbitúrico, Albumina de soro bovino (BSA), Apocinina (A10809), Formaldeído a 10% tamponado, hidroxitolueno butilado (BHT), Ortovanadato de sódio, quite colorimétrico Superóxido dismutase (Fluka 19160) e Reagente de Bradford.

Synth<sup>®</sup> - Ácido acético PA, Etanol (EtOH) 99,8% PA, Glicose anidra, KCl, NaCl, Sacarose e Xilol.

Inlab – Escarlata Biebrich, Eosina, Fucsina, Hematoxilina e parafina (PF: 54-56 °C e 56-58 °C);

Invitrogen<sup>®</sup> - dodecil sulfato de sódio (SDS);

Parinex<sup>®</sup> - Heparina;

Humulin<sup>®</sup> - Insulina de ação rápida recombinante humana;

Roche Diagnostic<sup>®</sup> - Coquetel de inibidores de proteases;

Vetec<sup>®</sup> - ácido fosfomolíbico, ácido fosfotúngstico, Clorofórmio PA e metanol PA.

## 4.2. Métodos

### 4.2.1. Desenho Experimental

Após um período de ambientação, os animais foram aleatoriamente selecionados para a composição dos grupos experimentais, segundo fornecimento da dieta líquida forçada: o grupo **CT** (n = 07) recebeu água mineral; o grupo **ISO** (n = 07) recebeu uma solução de sacarose 290,5 g/L em água mineral; o grupo **EtOH** (n = 07 a 09) recebeu uma solução etílica à 20% (etanol absoluto PA 99,8° na água mineral) contendo solução aromatizante de morango (Dr. Oetker<sup>®</sup>, Brasil) em proporção 1:100, a fim de melhorar a palatabilidade. Como forma de adaptação e para evitar perdas por morte, este grupo recebeu de forma breve e gradual, 5% (v/v) de etanol na primeira semana, 10% (v/v) na segunda semana e 20% (v/v) na terceira semana e mantido por mais 12 semanas (Tirapelli et al, 2006; Resstel et al, 2006). O grupo **EtOHapo** (n = 07 a 09) recebeu solução de etanol à 20% (etanol absoluto PA 99,8° em água mineral) acrescida de uma dose de apocinina (A10809, Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) equivalente a 50 mg/kg/dia na água de beber, fornecida de forma gradual, similarmente ao grupo EtOH. Semanalmente, a dose de apocinina foi ajustada através do cálculo da média de peso corporal grupal e do consumo médio de líquidos do grupo. O conteúdo das garrafas era substituído a cada dois dias, como forma de minimizar possíveis erros em consequência de evaporação dos líquidos. O período experimental para todos os grupos foi de 14 semanas.

Para evitar possíveis vieses, grupos experimentais foram exclusivamente montados para análises específicas de pressão arterial sistólica (grupo 01), testes metabólicos (grupo 02) e para análise bioquímica e balanço oxidativo (grupo 03).

### 4.2.2. Determinação do peso corporal e consumo

Para determinar possíveis alterações do tratamento dietético líquido sobre o perfil corpóreo dos animais tratados foram realizadas as avaliações descritas na sequência.

#### 4.2.2.1. Peso Corporal

Os animais dos diferentes grupos foram pesados antes da intervenção experimental (tempo 0) e semanalmente durante o período experimental, respeitando-se os dias e horários para a avaliação, em balança semi-analítica (0,001g; Shimadzu<sup>®</sup>).

#### 4.2.2.2. Consumo líquido e alimentar

A administração das soluções para dieta líquida foi de caráter forçado por via oral, fornecida em garrafas-bebedouro em volume regulado antes e durante todo o período experimental. A média de consumo grupal foi verificada a cada dois dias, sendo substituído o volume consumido. Este procedimento objetivou, principalmente, minimizar possíveis perdas em decorrência da evaporação do teor etílico das mamadeiras. As soluções foram preparadas em volume de estoque em garrafas plásticas vedadas e acondicionadas em geladeira, com exceção da dieta EtOHapo, que era preparada imediatamente antes da troca e substituída a cada dois dias.

A média do consumo alimentar de ração dos grupos foi verificada antes do início do tratamento experimental e durante as 14 semanas seguintes. Este parâmetro foi calculado através da diferença da quantidade oferecida e o restante presente nas gaiolas. Essa medida foi realizada semanalmente. Ambas as mensurações foram tomadas, respeitando-se os mesmos dias e horários de avaliação. A média de ingesta sólida e líquida coletiva diária foi dada em gramas e em mililitros, respectivamente. Para o cálculo do consumo energético foi utilizado às informações fornecidas pelo fabricante (Nuvilab<sup>®</sup> CR-1 contendo 62,6% (2.200 Kcal/kg) de carboidratos, 25,6% (900 Kcal/kg) de proteínas e 11,8% (414 kcal/kg) de lipídios, fabricada no Brasil). Os valores foram estimados por média coletiva grupal, dados em quilocalorias (kcal) normalizados pelo peso individual semanal de cada animal.

#### 4.2.3. Teste de Tolerância à Glicose

Para determinar o efeito da cronicidade alcoólica sob o metabolismo da glicose foi realizado o teste de tolerância à glicose (TTG). Este foi iniciado após a submissão dos animais a 12 horas de jejum noturno, por aplicação intraperitoneal de uma solução de glicose a 20% (dose 2g.Kg<sup>-1</sup>) e, a partir de leve picote da cauda, uma gota de sangue foi ordenhada para a aferição da glicemia antes da aplicação (tempo zero) e nos tempos de 15', 30', 60', 90' e 120' em aparelho glicosímetro (Roche<sup>®</sup>; modelo Accu-Chek *Performa*). O teste foi realizado durante o período matutino após 14 semanas completas de tratamento.

#### 4.2.4. Teste de Sensibilidade à Insulina

Para determinar o efeito da cronicidade alcoólica sob a sensibilidade à insulina foi aplicado o teste de tolerância à insulina (TSI). Similar ao TTG, o TSI foi realizado através da

aplicação intraperitoneal de uma solução de insulina ( $0,1 \text{ U.mL}^{-1}$ ) de ação rápida (Humulin<sup>®</sup>) na dose  $0,75 \text{ U.Kg}^{-1}$ . O teste foi realizado durante o período matutino, e sem restrição alimentar, de modo a evitar o estresse e/ou a morte dos animais durante o teste.

#### 4.2.5. Determinação da Pressão arterial sistólica (PAS) e da Frequência cardíaca (FC)

As medidas foram obtidas pelo método indireto, através da plestimografia de cauda no período basal e semanalmente durante doze semanas sequenciais do protocolo experimental nos camundongos conscientes. Como forma de adaptação e para diminuir o estresse ao ambiente novo e contenção necessária, cinco dias antes da primeira aferição, os animais foram adaptados em cilindro de contenção de acrílico com abertura para o focinho e cauda, próprio para camundongos por cinco minutos. Este procedimento foi realizado uma vez por dia durante o tempo de adaptação supracitado.

Após este período, foram determinados os níveis da PAS (mmHg) e da FC (bpm). Para tanto, os animais foram colocados em contenção e aquecidos por iluminação incandescente localizada superior e imediatamente sobre o dorso do animal por três a cinco minutos. Em seguida, o oclisor e o sensor, específicos para camundongos, foram ajustados à porção proximal da cauda do camundongo. Acoplados a um esfigmomanômetro elétrico, que, por sua vez, estava conectado a um sistema de transdução analógico-digital (PowerLab<sup>®</sup>, ADInstruments, Melbourne, Austrália).

Foram realizadas, no mínimo, seis aferições por animal (4 a 5 animais/grupo). O valor final da PAS e da FC foi obtido pelas médias aritméticas das medidas sequenciais.

#### 4.2.6. Sacrifício dos animais e coleta dos tecidos

Ao término do período experimental do protocolo dietético líquido de 14 semanas e observando-se um pernoite de restrição alimentar (mínima de 12h e máxima de 16h) e sob anestesia de Ketamina/Xilazina ( $110/10 \text{ mg/Kg i.p.}$ ), os animais foram sacrificados por punção do ventrículo direito e o sangue coletado em microtubos plásticos heparinizados ( $500 \text{ U/mL}$ ). As amostras foram centrifugadas a  $4000 \text{ rpm/10'}$  e o plasma foi selecionado em alíquotas e imediatamente congeladas em gelo seco. Após a retirada do sangue, a cavidade torácico-abdominal foi aberta e todos os órgãos foram perfundidos por solução salina heparinizada ( $300 \text{ U/mL}$ ) através do ventrículo esquerdo. Após esse procedimento, foram cuidadosamente retirados e lavados individualmente em solução salina  $0,9\%$  estéril e retirado

o excesso de fluídos em papel absorvente conveniente, pesados em balança semi-analítica: cérebro, coração, pulmões, fígado, rins, adiposo epididimal, adiposo perirenal, adiposo mesentérico, gastrocnêmio, intestino. Em seguida, foram imediatamente acondicionados em gelo seco e colocados em estoque permanente em bioultrafreezer (-86°C). A tibia também foi retirada e guardada em -20°C para posterior avaliação do crescimento corporal.

#### 4.2.7. Medida de crescimento corporal

Como estimativa de crescimento longitudinal, a tibia direita foi retirada e limpa de tecidos conectivos e sua medida de comprimento realizada com o auxílio de um paquímetro. A avaliação também se deu através da normalização da relação peso corporal/comprimento tibial (g/cm).

#### 4.2.8. Perfil lipídico plasmático

Os níveis plasmáticos de colesterol e triglicerídeos circulantes foram mensurados através de “Kits” comerciais colorimétricos (Labtest<sup>®</sup>), adaptando-se o protocolo do fabricante para leitura em microplacas. As amostras foram diluídas em solução tampão PBS 0,01M (1:50 e 1:25, respectivamente). Em seguida, foi-se adicionado 100 µL do reagente em 100 µL da amostra diluída. A placa foi incubada por 20' e 15'/37°C, e a leitura da absorvância em leitor de microplacas (Termoscientific<sup>®</sup>, Software 2.4 *Multiskan Spectrum*) foram a 492 nm.

Para a determinação dos valores séricos das lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), utilizou-se da equação de Friedewalt (Friedewalt, Levi & Fredrickson, 1972):  
 $VLDL = \text{Triglicerídeos} / 5$ .

#### 4.2.9. Avaliação hepática

O tecido hepático foi selecionado para análise bioquímica e histológica, assim houve especial cuidado ao tecido hepático, a fim de evitar lesão mecânica antecipada que pudesse comprometer posteriores experimentos neste tecido.

##### 4.2.9.1. Perfil lipídico hepático

Utilizando-se do método gravimétrico, os lipídios hepáticos foram quantificados (Folch, Lees & Sloane Stanley, 1957). A partir de 100 mg de tecido hepático homogeneizado

em solução clorofórmio e metanol (2:1) em volume final de 20 vezes a do tecido. Após a homogeneização, foi adicionado 400 µL de metanol. O homogenato foi centrifugado a 3000 rpm/10' a temperatura ambiente e o sobrenadante reservado em tubo previamente pesado, onde foram acrescentados 800 µL de clorofórmio e 640 µL de cloreto de sódio a 0,73% e após nova centrifugação nas condições descritas. A fase inferior foi lavada três vezes com 600 µL de solução de Folch (clorofórmio a 3%, metanol a 48%, 47% de água destilada e 2% de cloreto de sódio a 0,29%). Após cada procedimento de lavagem, os tubos foram submetidos a ciclos de centrifugação e o sobrenadante desprezado. Os extratos lipídicos foram obtidos a partir da evaporação total da solução de Folch restante em estufa por 24 h à 37°C ou até a evaporação total. Os lipídios hepáticos foram quantificados pela diferença da pesagem do tubo mais a amostra de lipídios pelo peso do tubo inicialmente, em balança analítica (0,0001 g; Shimadzu<sup>®</sup>).

Os níveis de colesterol e triglicerídios hepáticos foram mensurados através de uso de “Kit” comercial (Labtest<sup>®</sup>), seguindo metodologia do fabricante, adaptando a leitura para microplacas (Termoplate<sup>®</sup>, Software 2.4 *Multiskan Spectrum*) a 492 nm.

#### 4.2.9.2. Balanço Redox

A atividade enzimática do balanço Redox hepático foi avaliada através da mensuração das enzimas Catalase e Superóxido dismutase e a medida da peroxidação lipídica hepática, a partir do homogenato de tecido hepático em tampão RIPA e da peroxidação lipídica plasmática.

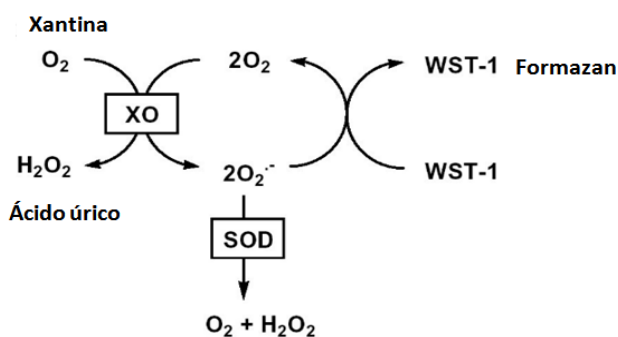
#### 4.2.9.3. Medida da atividade da Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi avaliada em homogenato do tecido hepático diluído 1:100 através de um “Kit” comercial colorimétrico (Fluka 19160, Sigma Aldrich<sup>®</sup>), seguindo as recomendações do fabricante. O método foi adaptado para microplacas de 96 poços (Termoscientific<sup>®</sup>, Software 2.4 *Multiskan Spectrum*) com leitura espectrofotométrica a 450 nm. Os dados foram normalizados pela concentração de proteínas totais no fígado, utilizando o método de Bradford (Bradford, 1976).

Sucintamente, o método é baseado na utilização do sal hidrossolúvel, o Tetrazólio,2-(4-Iodofenil)-2-(4-dinitrofenil)-2H-(5-tetrazólio)-1,3-benzeno dissulfonado, conhecido também por WST-1. Este sofre redução do  $\bullet\text{O}_2^-$  e o produto formado é WST-1 “formazan”,

um cromógeno de cor amarela. A taxa de redução com  $O_2$  é linearmente relacionada à atividade da xantina oxidase (XO) e inibida pela SOD. Assim, a atividade desta última é expressa como porcentagem de inibição da XO pela SOD. A Figura 03 mostra o princípio da reação.

**Figura 07** - Princípio do ensaio da atividade da Superóxido dismutase (SOD), segundo o “Kit” Fluka 19160. O sal hidrossolúvel, o Tetrazólio, 2-(4-Iodofenil)-2-(4-dinitrofenil)-2H-(5-tetrazólio)-1,3-benzeno dissulfonado, conhecido também por WST-1. Este sofre redução do  $O_2^-$  e o produto formado é WST-1 Formazan, um cromógeno de cor amarela. A taxa de redução com  $O_2$  é linearmente relacionada à atividade da xantina oxidase (XO) e inibida pela SOD.



Fonte: Fluka 19160.

#### 4.2.9.4. Medida da atividade da Catalase (CAT)

A atividade da CAT foi mensurada através de metodologia desenvolvida por Rabêlo sob processo de patente, e este se encontra em fase obtenção da proteção intelectual. Por este motivo, não há descrição detalhada para reprodução metodológica. Em resumo, procedeu-se neste o preparo dos reagentes imediatamente antes da reação. Utilizou-se diluição 1:600 de homogenato hepático em tampão PBS 10  $\mu$ L mais 20  $\mu$ L de  $H_2O_2$  (0,001 M) adicionados a microplaca e um cromógeno pipetado diretamente na placa. O produto reacional final foi lido em leitor de microplacas a 540 nm em leitor de microplacas (Termoscientific<sup>®</sup>, Software 2.4 *Multiskan Spectrum*). Foi realizada curva-padrão para cálculo das amostras. A atividade enzimática foi normalizada por concentração de proteínas totais hepática (Bradford, 1976).

#### 4.2.9.5. Peroxidação lipídica hepática e sistêmica



A medida da peroxidação lipídica foi baseado no método descrito por Wallin et al (1993), adaptado para leitura em microplaca através da detecção das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRATB). Esta avaliação é indireta e detecta a presença do metabólico malonildialdeído (MDA). Amostras de homogenato hepático (100 µL) e plasma (100 µL), individualmente foram misturadas a 10 µL do antioxidante hidroxitolueno butilado, conhecido pela sigla inglesa BHT (*Butylated hydroxytoluene*) e a 1250 µL de uma solução de ácido tiobarbitúrico a 1,3% (Sigma Aldrich®). Depois disso, as amostras foram incubadas a 100°C/60' e seguiu-se em banho de gelo/10' para interromper reação. As amostras foram centrifugadas 3000 rpm/15' a temperatura ambiente. A leitura da absorbância foi realizada em leitor para microplacas (Termoscientific®, 2.4 *Multiskan Spectrum*) a 532 e 600 nm.

#### 4.2.10. Morfologia hepática

O lobo maior (lobo direito) hepático foi utilizado como referência para a análise histológica. Secções teciduais distais com aproximadamente 5 mm de espessura foram fixadas em formalina tamponada à 10%. Após esse procedimento, desidratadas em concentrações crescentes de etanol (70%, 90%, 100% e 100% por 5' cada), diafanizados em xilol (dois banhos de 60' cada) e impregnados por parafina (dois banhos em parafina 57-58°C/ 60' cada) e incluídos nesta (55-56°C). Em seguida, foram realizadas secções seriadas 4-6 µm em micrótomo (Leica®) e colocadas em lâminas de vidro.

O lobo direito e quadrado também serviram de referência para seleção tecidual para dosagem bioquímica tecidual. Aproximadamente 100 mg de fragmento tecidual foi reservada para análises posteriormente descritas.

##### 4.2.10.1. Coloração hematoxilina-eosina (H&E)

As secções histológicas foram desparafinadas sequencialmente em imersões de xilol (três banhos). Na sequência, foram hidratadas em banhos de concentrações decrescentes de etanol (100%, 100%, 90% e 70%) em água destilada. Em seguida, o material biológico foi corado em hematoxilina de Harris/60'', lavado em água corrente/5' e novamente corado em eosina/60''. Após este processo, foram desidratadas em banhos crescentes de etanol (70%, 90%, 100%), clarificadas em xilol e montadas lâminas permanentes para análise histopatológica posterior.

As imagens representativas foram capturadas utilizando-se um sistema de captura de imagens computadorizado acoplado ao microscópio óptico (Nikon DS-Ri1).

#### 4.2.10.2. Coloração tricromo de Masson

Para evidenciar deposição do colágeno tipo I decorrente do tratamento dietético com possível instalação de estado fibrótico, foi realizada a coloração de tricromo de masson. Similar a H&E, secções histológicas foram desparafinadas em banhos sequenciais de xilol (três banhos), hidratadas em banhos de concentrações decrescentes de etanol (100%, 100%, 90% e 70%) e em água destilada. Em seguida, foram coradas em hematoxilina férrica de weigert/5', lavadas em água corrente/5' e água destilada/5' e coradas em fucsina ácida e escarlate Biebrich/5', sendo lavadas em dois banhos de água destilada/5' cada, em sequência tratadas pelo ácido fosfotúngstico e ácido fosfomolibdico (1:1). Por último, coradas pelo azul de anilina-acética/15', lavadas em água destilada e diferenciadas por solução acética a 1%. Após este processo, foram desidratadas em banhos crescentes de etanol (70%, 90%, 100%), clarificadas em xilol e montadas lâminas permanentes.

As imagens representativas foram capturadas utilizando-se um sistema de captura de imagens computadorizado acoplado ao microscópio óptico (Nikon DS-Ri1).

#### 4.2.10.3. Quantificação de vacúolos

Os cortes de tecido hepático corado em H&E foram analisados no aumento de 40x, 100x e 400x em microscópio óptico (Olympus). Adotou-se o seguinte critério avaliativo: foram fotografados, ao menos, três (100x) e cinco (400x) diferentes campos apropriados (sem ranhuras, dobras ou bolhas) para descrição de achados morfológicos nos grupos. A partir destas fotomicrografias, a presença de vacúolos (esteatose) foi graduada por método semiquantificativo com adaptações (Hong et al, 2004), baseado na porcentagem de hepatócitos envolvidos: **grau 0** – > 5% de hepatócitos envolvidos, **grau 1** – 5% - 33% de hepatócitos envolvidos, **grau 2** – 33%-66% de hepatócitos envolvidos, **grau 3** – > 66% de hepatócitos envolvidos.

As imagens representativas foram capturadas utilizando-se um sistema de captura de imagens digital computadorizado acoplado ao microscópio óptico (Nikon DS-Ri1).

#### 4.2.10.4. Estadiamento da lesão hepática

Os aspectos e diagnóstico histopatológico foram avaliados nas lâminas de H&E (coloração de rotina) e de tricromo de Masson, qualitativamente por um patologista experiente (Profa. Maria das Graças Soares Moura Resende, CRM-AL 1019). A avaliação tomou por referência o modelo de desenvolvimento de esteatohepatite, baseados na presença do diagnóstico de esteatohepatite (1), possível esteatohepatite ou caso-limite (2) e ausência de esteatohepatite (3). A graduação foi baseada na presença de cinco amplas características reconhecidas na doença hepática: esteatose, inflamação, injúria ao hepatócito, fibrose e outros aspectos variados possíveis de serem encontrados em modelo de esteatohepatite - corpúsculos de Mallory e núcleo glicogenado (Kleiner et al, 2005). Os resultados foram alocados individualmente por animal em tabela própria.

#### 4.2.11. Atividade enzimática e níveis séricos de proteínas totais e albumina dos principais marcadores de lesão hepática

Para avaliar o estado funcional e possíveis danos provocados pelo consumo dietético crônico de etanol ao tecido hepático, foram avaliados níveis séricos de proteínas totais e albumina e a atividade enzimática das aminotransferases alanina (ALT) e Aspartato (AST), fosfatase alcalina (FAL),  $\gamma$ -glutamilttransferase ( $\gamma$ -GT) e a desidrogenase láctica (DHL). Para a realização destes procedimentos, o plasma foi utilizado e obtido do sangue coletado conforme descrição feita no subitem 4.6. O sangue foi centrifugado a 4000 rpm e o plasma foi imediatamente selecionado e congelado em gelo seco. Logo após, as amostras plasmáticas foram transferidas e mantidas em bioultrafreezer -86°C até o momento das análises.

As análises foram realizadas segundo descrição da metodologia recomendada pelo fabricante de “Kit” colorimétricos da LabTest<sup>®</sup>, adaptando os protocolos para leituras em microplacas (Termoplate<sup>®</sup>, Software 2.4 *Multiskan Spectrum*). Foram feitas alíquotas do plasma em diferentes diluições em tampão PBS 0,01 M, conforme o parâmetro a ser analisado e com respectiva leitura espectrofotométrica: AST (1:4),  $\lambda = 340$  nm; ALT (1:2),  $\lambda = 405$ ; FAL (1:2),  $\lambda = 405$ ;  $\gamma$ -GT (1:2),  $\lambda = 405$  nm; DHL (1:2),  $\lambda = 500$  nm; albumina (1:100),  $\lambda = 630$  nm e proteínas totais (1:500),  $\lambda = 595$  nm. A razão AST/ALT foi obtida pela atividade das respectivas enzimas.

#### 4.2.12. Análise e Expressão de dados

Todos os dados foram expressos em média e erro padrão da média (média  $\pm$  epm). Foi utilizada a análise de variância simples em uma ou duas vias, seguindo do pós-teste de *Kramer-Tukey* ou *Bonferroni*. Foi utilizado teste exato de Fisher para estudo histopatológico. Para as demais análises foi utilizado o teste *t* não-pareado quando apropriado. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. Utilizou-se o programa Excel<sup>®</sup> (Microsoft, Santa Bárbara, CA, USA) e Graph pad Prism<sup>®</sup> 5.0

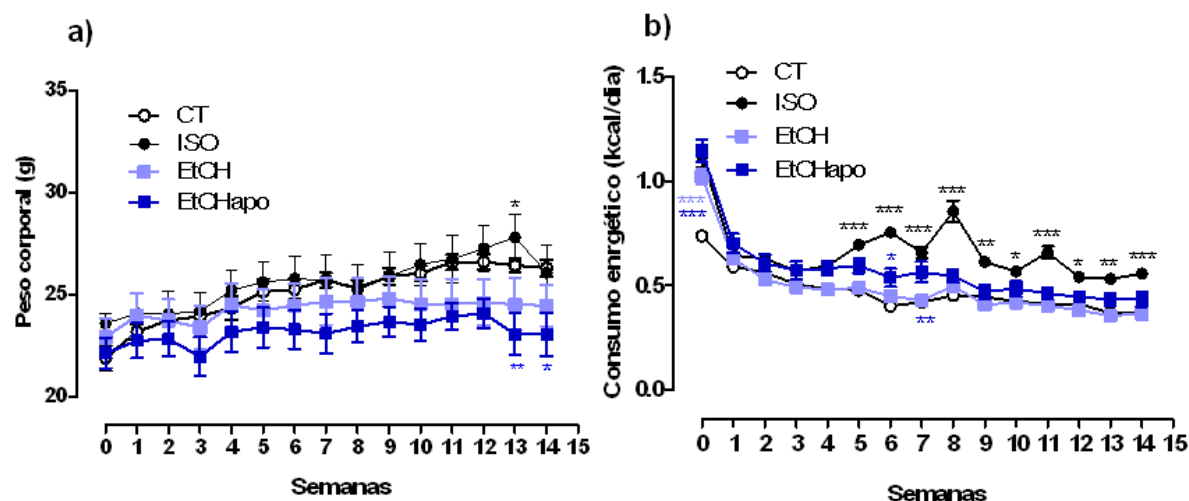
## **5. RESULTADOS**

### **5.1. Avaliação do peso corpóreo e consumo dos camundongos C57BL/6**

O tratamento etanólico induziu mudanças no peso corporal dos animais tratados com apocinina a partir da 13<sup>a</sup> semana de tratamento, evidenciando menor peso corporal do EtOHapo quando comparado ao CT. Essa diferença foi estatisticamente significativa na 13<sup>a</sup> semana ( $p < 0,01$ ) e manteve-se na 14<sup>a</sup> semana ( $p < 0,05$ ). Estes dados mostram que o tratamento crônico etanólico, associado à apocinina (50 mg/kg) promove manutenção e redução no ganho de peso corporal de animais C57BL/6 machos tratados por 14 semanas. Ocorre também, a partir da décima terceira semana aumento significativo de peso corporal do grupo ISO ( $p < 0,05$ ) em relação ao EtOHapo e não foi verificada quando comparada aos grupos CT e EtOH. Além disso, esta diferença não se mantém até o final do tratamento (Figura 08, a).

Para o consumo energético em quilocalorias/dia avaliado como média de consumo de líquidos e quanto ao consumo grupal de ração, normalizado pelo peso corporal de cada animal, apresentou aumento estatisticamente significativo de consumo calórico para o grupo ISO, controle positivo às calorias ingeridas pelo grupo EtOH. Tornando estatisticamente significativo a partir da quinta semana e estendeu-se até ao final do tratamento quando comparado aos animais CT (Figura 08, b). Nas figuras 08, c e d, é mostrada a média de consumo diário/semana de ração e de líquidos em se percebe maior consumo de líquidos pelos animais e ISO e de menor consumo para os animais que consumiram dieta etílica.

**Figura 08:** (a) Peso corporal dos camundongos tratados após 14 semanas em dieta líquida alcoólica. ANOVA duas vias, seguido do pós-teste de *Bonferroni*. \*\*  $P < 0,01$ , ISO comparado ao EtOHapo. Amostra de sete animais por grupo. (b) média do consumo energético em kcal/dia normalizado pelo peso corporal em gramas. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$  comparado ao CT, Amostra de 3-4 animais por grupo.



## 5.2. Avaliação do consumo de líquidos e de ração

A Tabela 2 apresenta o perfil do consumo global dos animais submetidos ao tratamento alcoólico de líquidos e de ração, e as quilocalorias ingeridas. O consumo alimentar em gramas e em quilocalorias apresentou-se estatisticamente reduzido nos grupos ISO ( $p < 0,001$ ) e EtOH ( $p < 0,05$ ) quando comparados ao grupo CT. Enquanto no que se refere ao consumo de líquidos, este parâmetro foi maior nos animais ISO (CT vs ISO,  $p < 0,001$ ) e apresentou-se reduzido nos animais EtOH (CT e ISO vs EtOH,  $p < 0,001$ ) e EtOHapo (ISO vs EtOHapo,  $p < 0,01$ ).

O consumo da solução de sacarose apresentou-se significativamente elevada no grupo ISO (CT vs ISO,  $p < 0,001$ ) e diminuído nos grupos EtOH (CT e ISO vs EtOH,  $p < 0,001$ ) e EtOHapo (CT vs EtOHapo,  $p < 0,01$ ; ISO vs EtOHapo,  $p < 0,001$ ) e o consumo energético fornecido por essas dietas também tiveram perfis semelhante. O consumo energético total fornecidos pelas dietas foi estatisticamente significativo para o grupo ISO ( $18,44 \pm 1,01$ ,  $p < 0,001$ ) quando comparado ao CT. Entretanto, quando se compara o total de calorias ingeridas pelo grupo EtOH e EtOHapo, em relação ao grupo CT, essa diferença não

permanece. O que indica que o acréscimo calórico da dieta etanólica para os grupos EtOH e EtOHapo não ampliou o consumo de calorias totais.

Destaca-se também que o consumo em gramas de etanol pelos grupos EtOH e EtOHapo apresentou média diária em gramas de etanol por consumo de 0,382 g (0,024 g/kg) e 0,489 g (0,049 g/kg), respectivamente. Esse valor representa um baixo consumo alcoólico e coloca este modelo para o consumo crônico leve.

**Tabela 02.** Características gerais do consumo alimentar dos camundongos C57BL/6 após 14 semanas de consumo etanólico .

	CT (3)	ISO (3)	EtOH (4)	EtOHapo (4)
Consumo alimentar (g/dia)	3,41 ± 1,3	1,96 ± 0,24 <sup>a</sup>	2,64 ± 0,16 <sup>c,f</sup>	2,92 ± 1,17 <sup>e</sup>
Consumo alimentar (Kcal/dia)	12 ± 0,44	6,9 ± 0,84 <sup>a</sup>	9,29 ± 0,56 <sup>c,f</sup>	10,27 ± 0,6 <sup>e</sup>
Consumo líquido (mL/dia)	4,96 ± 0,35	9,54 ± 0,64 <sup>a</sup>	2,42 ± 0,18 <sup>a,d</sup>	3,1 ± 0,17 <sup>b,d</sup>
Consumo líquido (Kcal/dia)	-	11,54 ± 0,91	3,18 ± 0,4 <sup>d</sup>	4,01 ± 0,44 <sup>d</sup>
Consumo energético total (Kcal/d)	12 ± 0,44	18,44 ± 1,01 <sup>a</sup>	12,47 ± 0,89 <sup>d</sup>	14,28 ± 0,95 <sup>e</sup>

Os valores estão expressos média ± epm. ANOVA uma-via, pós-teste de Kramer-Tukey. O número de camundongos está indicado entre parênteses.

<sup>a</sup>  $P < 0,001$  comparado com CT.

<sup>d</sup>  $P < 0,001$  comparado com ISO

<sup>b</sup>  $P < 0,01$  comparado com CT

<sup>e</sup>  $P < 0,01$  comparado com ISO.

<sup>c</sup>  $P < 0,05$  comparado com CT.

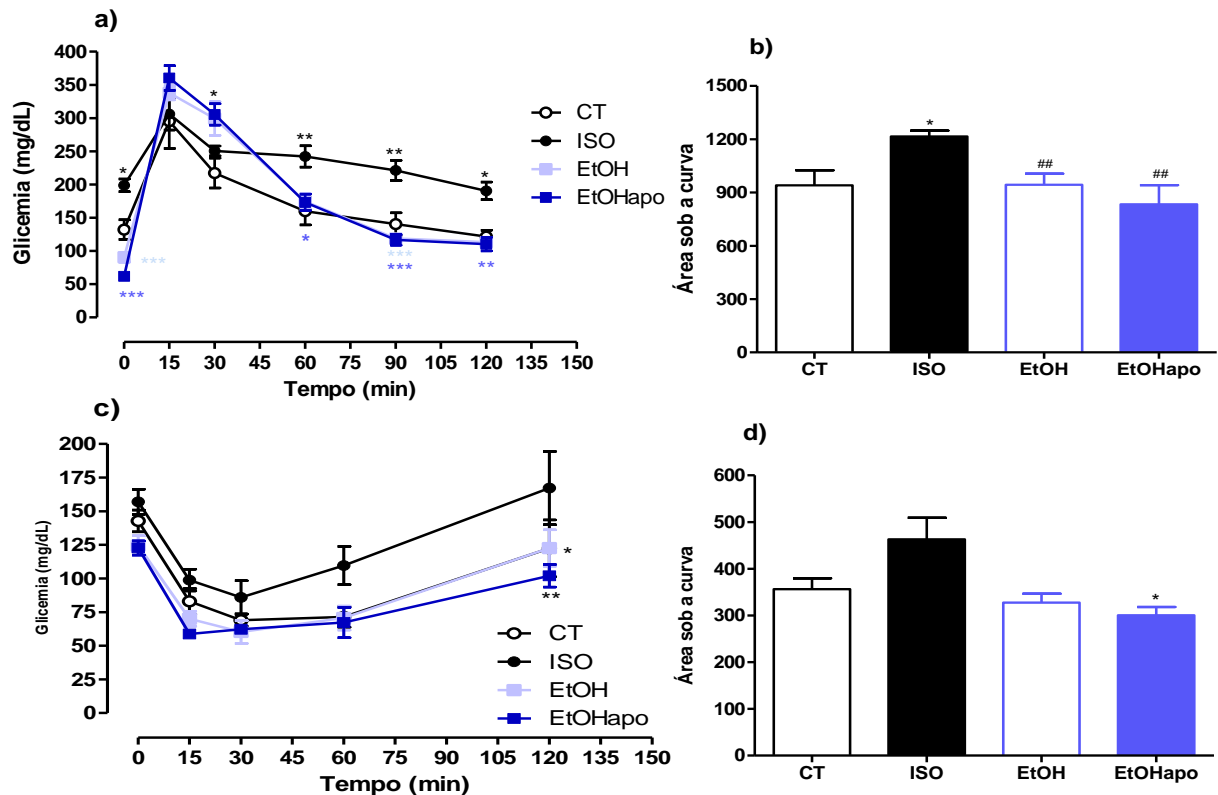
<sup>f</sup>  $P < 0,05$  comparado com ISO.

### 5.3. Perfil glicêmico do TTG e TSI

Os tempos avaliados nas curvas glicêmicas mostraram que os grupos que consumiram EtOH e EtOH mais apocinina durante 14 semanas ininterruptas exibiram perfil bastante semelhante, havendo uma elevação inicial de glicose no tempo de 15' superior ao grupo ISO ( $p < 0,01$ ) e ao CT. Nos tempos seguintes, mostram decaimento nos tempos seguintes retornando ao perfil inicial de jejum. Os grupos controles CT e ISO que receberam, respectivamente, água mineral e solução de sacarose, apresentam perfis bem distintos. O grupo ISO exibe curva menos acentuada em relação aos grupos que consumiram etanol, com elevação de glicose plasmática discreta no tempo de 15' e tendência linear até o tempo de 120' (Figura 9, a). Contudo, já apresenta uma hiperglicemia de jejum (tempo zero), alterando muito pouco a glicemia plasmática após a sobrecarga de glicose. O perfil glicêmico do TTG dos grupos é apresentado na área sob a curva (Figura 9, b). Esse exibe um perfil para hiperglicemia para o grupo ISO ( $p < 0,05$ , comparado ao CT;  $p < 0,01$  comparados ao EtOH e EtOHapo).

Já para a curva glicêmica do TSI realizada após 14 semanas de tratamento alcoólico (aplicação i.p. 0,75 U Kg<sup>-1</sup>), quando nos tempos 0', 15', 30' e 60', não exibe um perfil de glicemia diferente estatisticamente entre os grupos tratados com EtOH, porém há uma elevação da glicemia do grupo ISO a partir do tempo de 60' e se torna significativa no tempo de 120', mostrando uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos ISO e os grupos tratados com etanol ( $p < 0,01$ ). Esse padrão sugere que os grupos tratados com etanol apresentam resposta de maior sensibilidade à insulina em relação aos grupos que consumiram água mineral ou sacarose e a adição de apocinina não ampliou esta resposta quando administrada concomitante ao uso de solução alcoólica por via oral cronicamente.

**Figura 09.** a) Teste de Tolerância à glicose intraperitoneal realizado em período de jejum alimentar sólido noturno mínimo de 12h e máximo de 16h. ANOVA, pós-teste *Bonferroni*; b) Área sob a curva do teste de tolerância, Teste *t* de Student não-pareado; c) Teste de Sensibilidade à insulina intraperitoneal. ANOVA, pós-teste de *Bonferroni* e sua área sob a curva em d), Teste *t* de Student não-pareado [ ##  $p < 0,01$  comparado com ISO; \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  e \*\*\*  $P < 0,001$  comparado com CT].

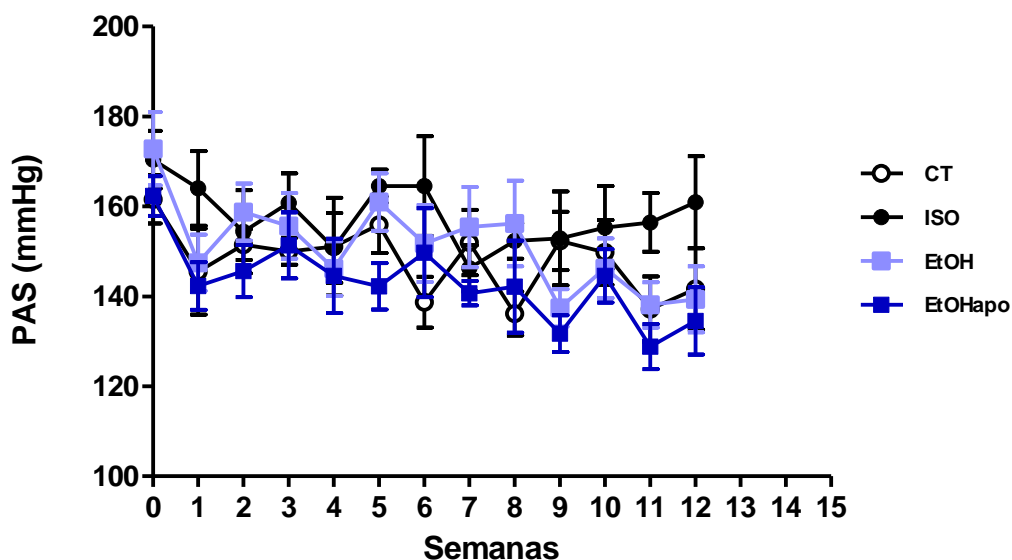




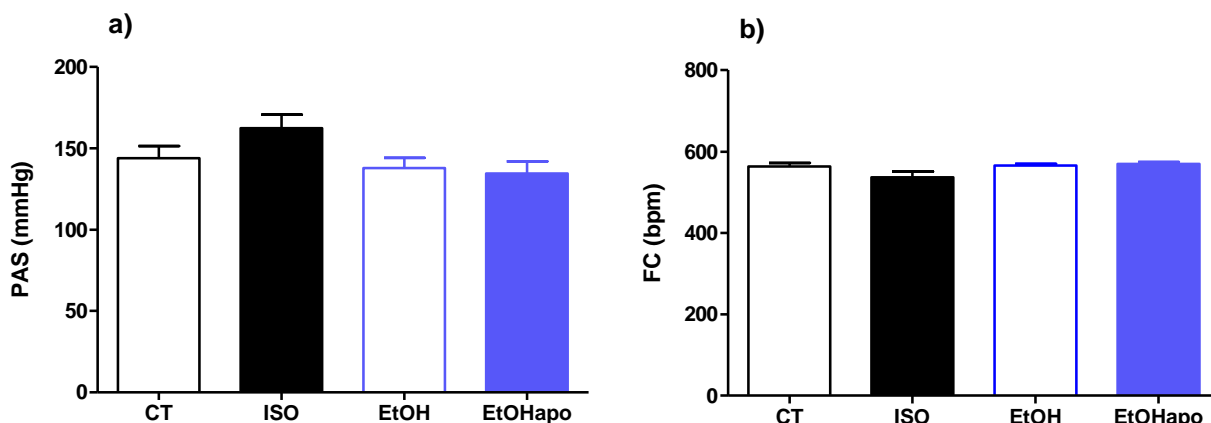
#### 5.4. Pressão arterial sistólica (PAS) e Frequência cardíaca (FC)

Na avaliação da pressão arterial sistólica (PAS) obtida por plestimografia de cauda no período basal e nas doze primeiras semanas de tratamento etanólico, não foi observado diferença significativa da PAS entre os grupos tratados durante todo o tratamento (Figura 10) e nem houve diminuição da pressão arterial basal. O tratamento crônico com etanol 20% em dieta forçada não elevou a pressão arterial sistólica e o uso da apocinina não alterou essa resposta para nenhum dos grupos tratados. O que se sugere que o tratamento alcoólico crônico a 20%, dado à vontade, não induz a hipertensão sistólica e não alterou a FC em camundongos C57BL/6 e o tratamento oral com apocinina não possui efetividade para alterar este parâmetro nesse modelo (Figura 11).

**Figura 10:** Pressão arterial sistólica (PAS) temporal (Basal à 12ª semana de tratamento alcoólico) avaliada por plestimografia de cauda dos C57BL/6 tratados por 14 semanas com dieta líquida – água mineral (CT=04), sacarose [290,5g/L] (ISO=04) e solução etílica 20% v/v (EtOH=05) e solução de etanol 20% + Apocinina (50 mg/kg; EtOHapo=05).



**Figura 11:** Pressão arterial sistólica (PAS) e Frequência cardíaca (FC) avaliadas no tempo final (12ª semana de tratamento alcoólico) por plestimografia de cauda dos C57BL/6 tratados por 14 semanas com dieta líquida – água mineral (CT=04), sacarose [290,5g/L] (ISO=04) e solução etílica 20% v/v (EtOH=05) e solução de etanol 20% mais apocinina (50 mg/kg; EtOHapo=05).



### 5.5. Avaliação do perfil biométrico

O ganho de peso corporal se mostrou diminuído nos grupos EtOH e EtOHapo quando comparados ao CT ( $p < 0,01$ ) e quando comparados ao grupo ISO. Os grupos EtOH e EtOHapo apresentaram peso corporal menor ( $p < 0,05$ ) e ( $p < 0,001$ ), respectivamente. O crescimento ósseo epifisário, avaliado através da tíbia direita, a medida céfalo-caudal e circunferência abdominal não exibiram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (Tabela 03).

**Tabela 03.** Características biométricas dos camundongos submetidos ao protocolo dietético etílico.

	CT (7)	ISO (6)	EtOH (9)	EtOHapo (6)
Ganho de Peso (14 semanas)	4,41 ± 0,34	3,38 ± 1,3	1,72 ± 0,17 <sup>a</sup>	1,79 ± 0,55 <sup>a</sup>
Peso corporal (g)	26,1 ± 0,4	26 ± 1,4	24,5 ± 1,0 <sup>c</sup>	23,0 ± 1,1 <sup>a,b</sup>
Tíbia direita (cm)	1,76 ± 0,01	1,75 ± 0,01	1,73 ± 0,02	1,72 ± 0,02
Comprimento céfalo-caudal (cm)	17,7 ± 0,14	17 ± 0,4	17,4 ± 0,3	17,3 ± 0,4
Circunferência abdominal (cm)	1,76 ± 0,02	1,75 ± 0,01	1,73 ± 0,02	1,72 ± 0,02
Peso corporal/ tíbia (g/cm)	14,92 ± 0,3	14,9 ± 0,72	14,10 ± 0,51	13,43 ± 0,62
Comprimento céfalo-caudal/ circunferência abdominal (cm)	2,2 ± 0,04	2,07 ± 0,05	2,04 ± 0,03	2,01 ± 0,07

Os valores são expressos média±epm. ANOVA uma-via, pós-teste de *Bonferroni*. O número de camundongos está indicado entre parênteses.

<sup>a</sup>  $P < 0,01$  comparado com CT.

<sup>b</sup>  $P < 0,001$  comparado com ISO

<sup>c</sup>  $P < 0,05$  comparado com ISO.

O peso tecidual bruto dos órgãos e tecido selecionados apresentou padrões diferenciados nos respectivos grupos tratados. A razão de disposição de tecido adiposo perirenal dos grupos tratados com etanol mostrou-se estatisticamente menor em relação ao grupo ISO ( $p < 0,05$ ). De forma diferenciada, a razão do peso intestinal apresenta-se estatisticamente diminuído no grupo ISO em relação ao CT (Tabela 04) e, contrariamente, houve uma elevação estatisticamente significativa do peso relativo intestinal do grupo EtOHapo em comparação com o ISO ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 04.** Características teciduais dos camundongos submetidos ao protocolo dietético etílico.

	CT (7)	ISO (7)	EtOH (7)	EtOHapo (7)
Fígado relativo (%)	4,5 ± 0,12	4,6 ± 0,4	4,94 ± 0,12	4,8 ± 0,17
Adiposo Epididimal relativo (%)	1,73 ± 0,5	2,03 ± 0,3	1,14 ± 0,07	1,05 ± 0,11
Adiposo Perirenal relativo (%)	0,4 ± 0,05	0,7 ± 0,12	0,31 ± 0,04 <sup>b</sup>	0,32 ± 0,08 <sup>b</sup>
Adiposo mesentérico relativo (%)	1,97 ± 0,12	2,04 ± 0,24	1,73 ± 0,1	1,8 ± 0,1
Adiposidade (%)	4,11 ± 0,4	4,75 ± 0,65	3,1 ± 0,14 <sup>b</sup>	3,04 ± 0,18 <sup>b</sup>
Intestino relativo (%)	3,44 ± 0,07	2,72 ± 0,22 <sup>a</sup>	3,34 ± 0,13	3,7 ± 0,17 <sup>c</sup>
Coração relativo (%)	0,47 ± 0,02	0,51 ± 0,01	0,49 ± 0,02	0,54 ± 0,03
Cérebro relativo (%)	1,7 ± 0,02	1,67 ± 0,08	1,77 ± 0,04	1,76 ± 0,07
Gastrocnêmico relativo (%)	0,5 ± 0,04	0,45 ± 0,05	0,54 ± 0,06	0,49 ± 0,05

Os valores são expressos média ± epm. ANOVA *uma-via*, pós-teste de Tukey-Kramer. O número de camundongos está indicado entre parênteses.

<sup>a</sup>  $P < 0,05$  comparado com CT.

<sup>b</sup>  $P < 0,05$  comparado com ISO.

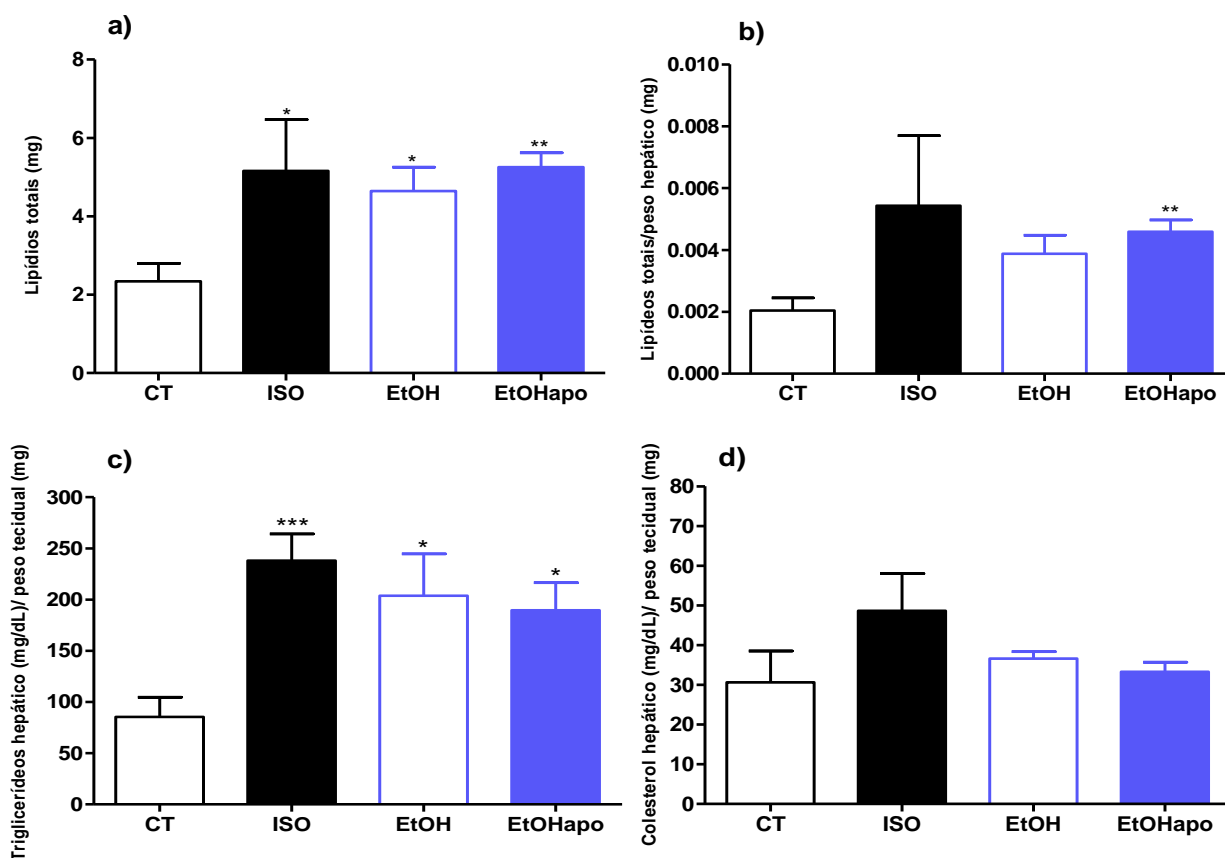
<sup>c</sup>  $P < 0,01$  comparado com ISO.

## 5.6. Avaliação do perfil lipídico hepático

O perfil lipídico hepático, avaliado ao final das 14 semanas, mostrou-se significativamente alterado nos grupos que receberam dieta líquida alcoólica. Os grupos ISO, EtOH e EtOHapo exibiram aumento estatisticamente significativo de lipídios totais no fígado quando comparados ao grupo CT (figura 12, a). No entanto, essa elevação estatisticamente significativa só se evidencia para o grupo EtOHapo, quando os lipídios totais é normalizado pelo peso tecidual hepático (figura 6,b).

Os níveis de triglicerídeos hepáticos se mostraram significativamente maiores para o grupo ISO (figura 6, c) quando comparado ao CT ( $p < 0,001$ ), e se manteve elevado para os grupos que consumiram e etanol concomitante a apocinina. Já o teor de colesterol hepático não se apresentou alterado entre os grupos (figura 12, d).

**Figura 12:** Lipídios totais hepáticos (a); Lipídios totais/ peso hepático (b); triglicerídios (c), e colesterol (d) hepático dos camundongos C57BL/6 tratados por 14 semanas em dieta líquida - água mineral (CT), sacarose [290,5 g/L] (ISO) e solução etílica 20% v/v (EtOH) e solução 20% + Apocinina (50 mg/Kg). Teste *t* de Student não-pareado. Cada barra do gráfico representa a média ± EPM [\*<sub>p</sub> < 0.05, \*\*<sub>p</sub> < 0.01, \*\*\*<sub>p</sub> < 0.001].



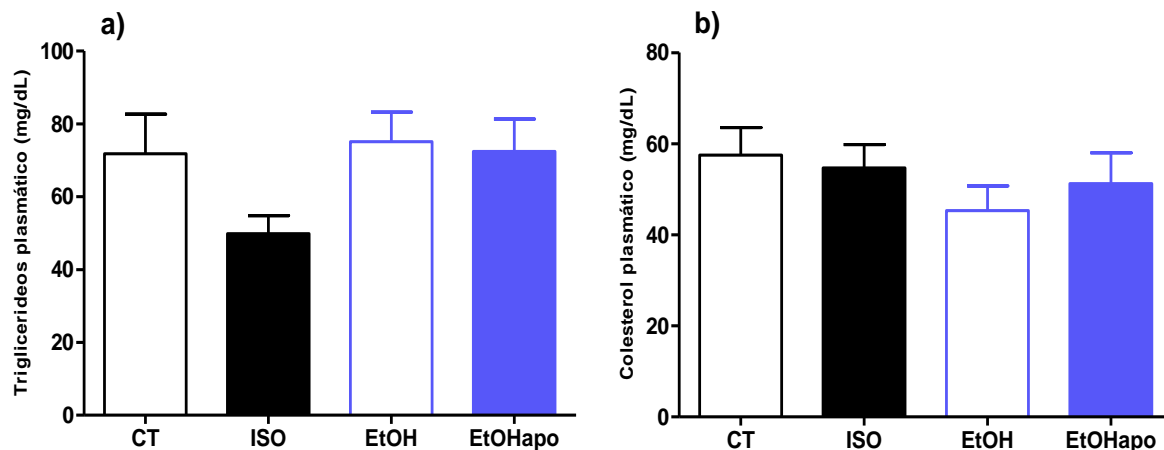
### 5.7. Avaliação do perfil lipídico plasmático

A figura 13 apresenta os níveis de triglicerídeos e colesterol plasmático dos animais tratados por 14 semanas. Observa-se nos gráficos (Figuras 13 a,b) que não houve diferença significativa entre o CT e EtOH ou CT e EtOHapo. No entanto, o perfil lipídico para o controle positivo ISO, observado no plasma para triglicerídeos, é menor em relação ao CT e aos tratados com dieta etanólica, o que mostra uma relação inversa de acúmulo de triglicerídeos maior no tecido hepático do que aos valores circulantes. Em contraste, o tratamento apenas com etanol a 20% e/ou associado à administração de apocinina não modificou este perfil metabólico.

Os valores séricos de VLDL obtidos a partir da fórmula proposta por Friedriwalk, a saber,  $VLDL = \text{Triglicerídeos}/5$ , não demonstraram alteração estatisticamente significativa

entre os grupos, pois se apresentam proporcionalmente reduzidos aos valores séricos de triglicerídeos, como demonstrado na equação matemática acima descrita (dados não apresentados).

**Figura 13:** Triglicerídeos (a) e Colesterol total (b) plasmático total obtido após as 14 semanas de tratamento em dieta líquida alcoólica e apocinina. Teste *t* de Student não-pareado. Cada barra do gráfico representa a média  $\pm$  epm.

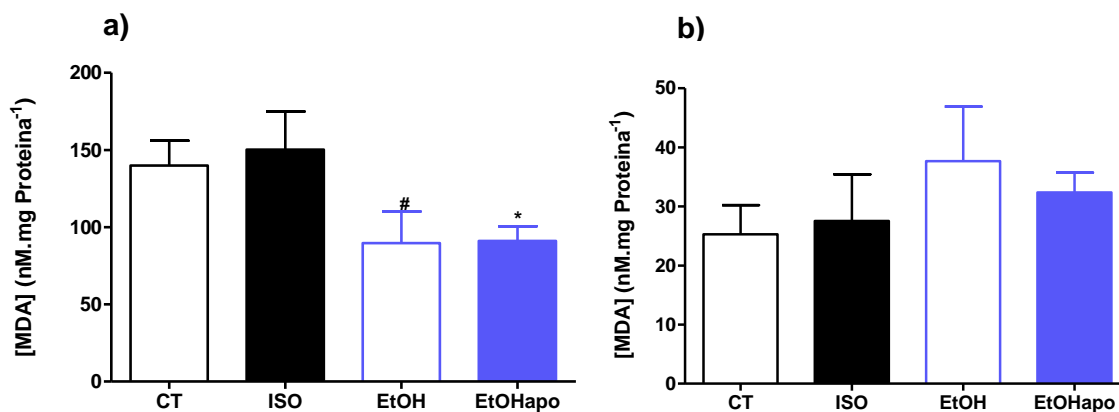


## 5.8. Avaliação do balanço REDOX

### 5.8.1. Avaliação da Peroxidação lipídica hepática e plasmática

Os níveis de malonildialdeído, avaliado neste experimento como medida indireta de peroxidação lipídica no fígado (medida local) e no plasma (medida sistêmica), apresentou-se significativamente diferente entre os grupos ISO e EtOHapo para os níveis hepáticos (Figura 14, a). Entretanto, os níveis plasmáticos foram semelhantes entre os grupos.

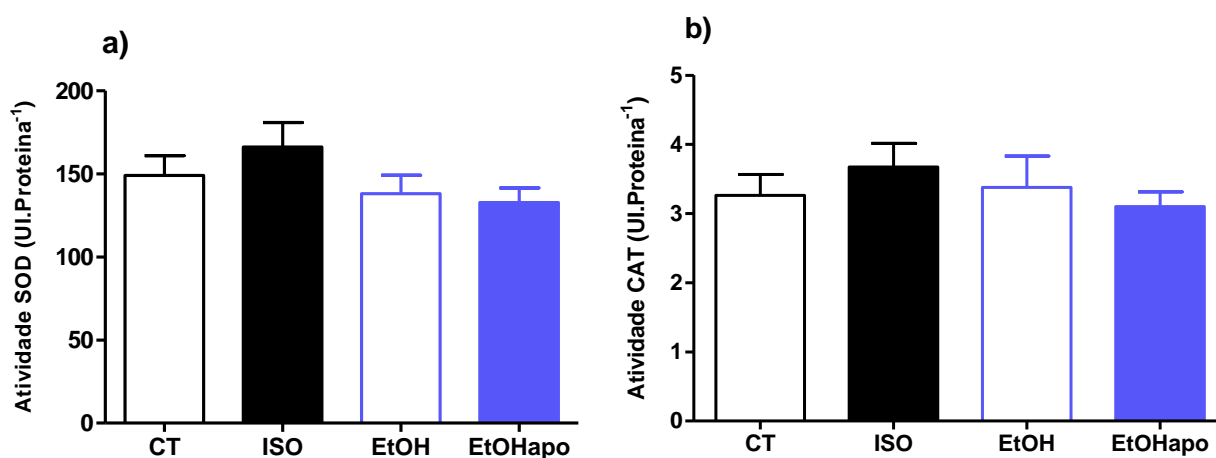
**Figura 14:** Peroxidação lipídica hepática (a) e plasmática (b) em concentração de malonildialdeído por miligrama de proteína hepática e plasmática após 14 semanas de dieta alcoólica e apocinina. Cada barra representa a média  $\pm$  epm. Amostra de sete animais por grupo. Teste *t* de *Student* não-pareado [ $*p < 0,05$  vs CT;  $\# p < 0,05$  vs ISO].



### 5.8.2. Avaliação da atividade da Superóxido dismutase (SOD) e Catalase (CAT)

A atividade da Superóxido dismutase (Figura 15, a), normalizada pelas proteínas totais do fígado, não apresentou diferença de atividade entre os grupos tratados. Para a atividade da Catalase, expressa em unidade enzimática por miligrama de proteína (UI/mg de proteína) também não foi observado diferença significativa entre os grupos após tratamento de 14 semanas.

**Figura 15:** Atividade da Superóxido dismutase (a) e da Catalase (b) nos camundongos tratados por 14 semanas em dieta alcoólica e apocinina. Teste *t* de *Student* não-pareado.



## 5.9. Atividade enzimática e níveis séricos de proteínas totais e albumina dos principais marcadores de lesão hepática

A atividade das enzimas que indicam a funcionabilidade hepática avaliada após 14 semanas de tratamento etílico (Tabela 06). Verificou-se redução significativa da atividade da AST e da razão AST/ALT dos animais tratados com etanol mais apocinina em relação ao grupo CT e EtOH ( $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ ). Esses resultados demonstram uma redução dos danos hepáticos profundos vistos através da redução da AST nos animais EtOHapo.

Os valores das enzimas ALT, FAL, LDH e  $\gamma$ -GT não se apresentaram alteradas em comparação ao grupo CT para nenhum dos outros grupos. Além disso, os níveis albumina e proteínas totais se mostraram inalterados em consideração à análise estatística usada.

**Tabela 05.** Atividade enzimática dos principais marcadores de injúria hepática e níveis plasmáticos de Albumina e Proteínas totais após 14 semanas de tratamento crônico alcoólico e apocinina.

	CT (4)	ISO (6)	EtOH (6)	EtOHapo (6)
AST (U/L)	162,8 ± 45	130,8 ± 23,6	184,5 ± 19,14	75,96 ± 22,53 <sup>a,b</sup>
ALT (U/L)	5490 ± 49,8	5497 ± 13,78	5484 ± 32,42	5551 ± 71,25
AST/ALT	0,03 ± 0,01	0,024 ± 0,01	0,033 ± 0,01	0,014 ± 0,009 <sup>a</sup>
FAL (U/L)	4560 ± 148,1	4794 ± 21,17	4739 ± 32,11	4749 ± 112
LDH (U/L)	515,4 ± 7,5	533,2 ± 11,98	522,3 ± 12,28	533,1 ± 10,7
$\gamma$ -GT (U/L)	28,75 ± 0,65	29,33 ± 0,3	29,2 ± 0,54	29,5 ± 1,0
Albumina (mg/mL)	3,87 ± 0,44	5,69 ± 2,4	3,48 ± 0,4	5,17 ± 2,0
Proteínas totais (mg/mL)	25,29 ± 4,9	27,54 ± 7,8	32,28 ± 9,3	32,36 ± 3,4

Os valores são expressos média ± epm. Teste *t* de Student não-pareado. O número de camundongos está indicado entre parênteses.

<sup>a</sup>  $P < 0,05$  comparado com CT.

<sup>b</sup>  $P < 0,01$  comparado com EtOH.

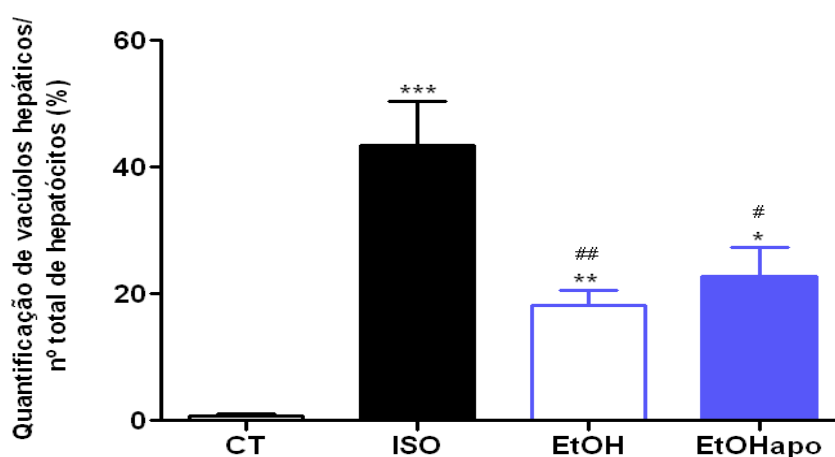
## 5.10. Avaliação histopatológica hepática

### 5.10.1. Estadiamento da esteatose

A exposição ao protocolo etanólico dietético por 14 semanas induziu a formação de vacúolos lipídicos nos grupos tratados. O método semiquantitativo utilizado, baseado na contagem visual de vacúolos por campo microscópico de grande aumento (400x), exibiu que apenas a dieta líquida e a dieta etanólica mais apocinina induziram a formação de microvacúolos em menor quantidade, de modo significativo, em relação ao grupo que recebeu solução de sacarose (290,5 g/L). Este último caracterizou-se pela formação de micro e

macrovacúolos e presença maciça de esteatose macrovesicular, caracterizando-se como modelo de degeneração lipídica. O gráfico apresentado na figura 16 demonstra maior formação de vacúolos e presença de esteatose no grupo que recebeu sacarose, entretanto nos grupos EtOH e EtOHapo apresentaram menor presença de vacúolos se comparado ao ISO Este, por sua vez, exibe diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo CT ( $p < 0,001$ ) e aos grupos EtOH ( $p < 0,01$ ) e EtOHapo ( $p < 0,05$ ). Os grupos de EtOH e EtOHapo apresentaram diferença significativa em relação ao CT ( $p < 0,01$ ) e ( $p < 0,05$ ), respectivamente.

**Figura 16** - Quantificação de microvacúolos e macrovacúolos (método semiquantitativo) nos C57BL/6 tratados por 14 semanas com dieta alcoólica mais apocinina. Amostra de sete a nove animais por grupo. Teste *t* de Student [ $*p < 0,05$ ;  $**p < 0,01$  e  $***p < 0,001$ ].



### 5.10.2. Estadiamento para modelo de esteatohepatite

Os achados histopatológicos observados em coloração de rotina de H&E e nas lâminas de tricromo de Masson indicaram o diagnóstico de esteatose para uma parte amostral (33,3%) para os animais EtOH, enquanto os animais EtOHapo que recebeu a mesma dieta combinada a apocinina não apresentaram esse diagnóstico quando vistos nos parâmetros analisados de graduação histopatológicos (Tabela 05).

Os parâmetros de inflamação, fibrose e processo de injúria celular apresentaram baixa graduação nos animais EtOH e EtOHapo, de acordo com análise feita por um patologista (média inferior ao grau 01), e foi significativamente menor quando comparado ao grupo ISO. Indicando que o processo de desenvolvimento de esteatohepatite não foi observado no modelo etílico, tanto nos grupos EtOH e EtOHapo. Enquanto os animais ISO



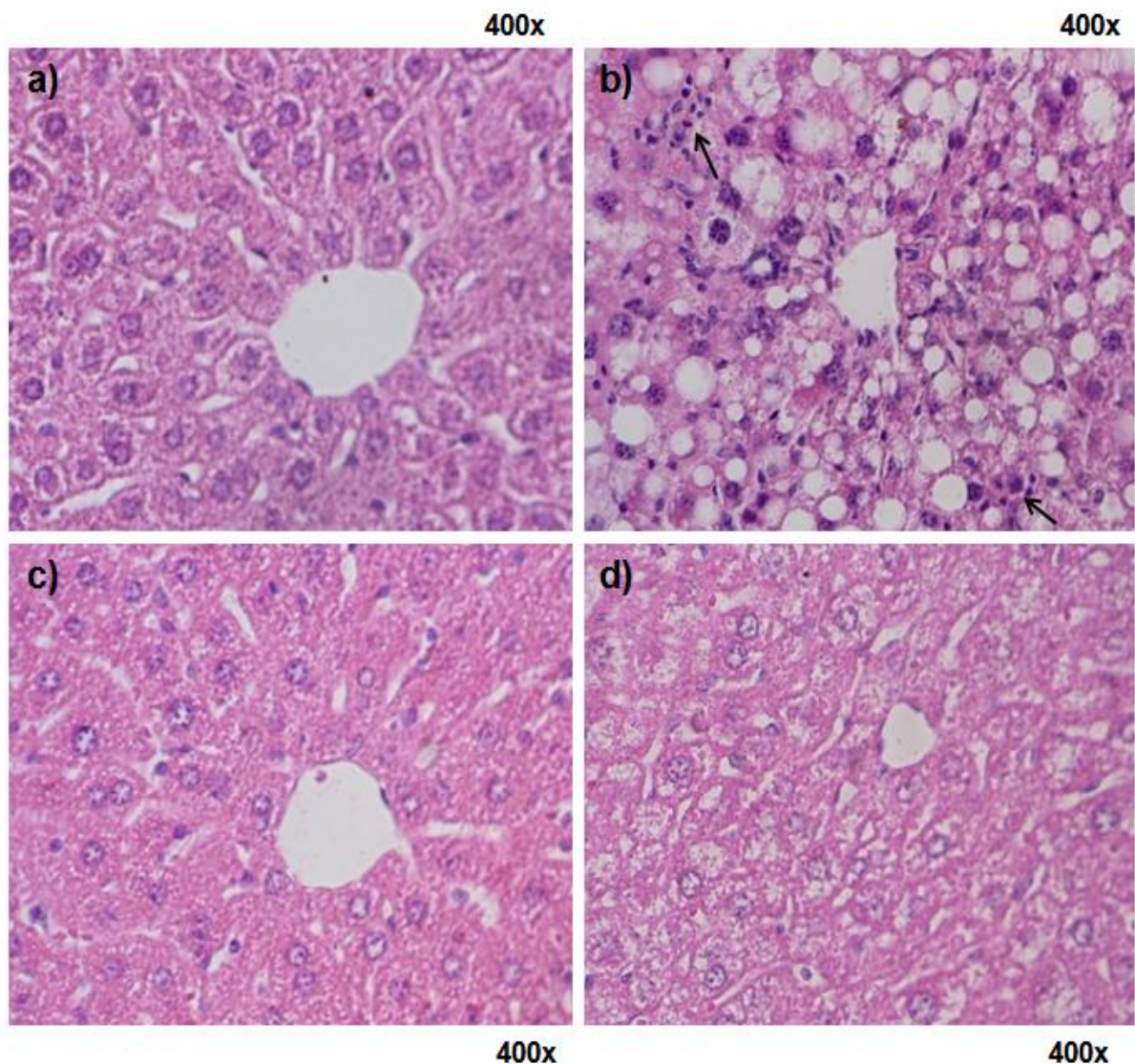
apresentaram mais de 40% de sua amostra com presença de esteatohepatite e elevada presença de fibrose tecidual (~ 57,2%). As figuras 17 (H&E) e 18 (Tricromo de Masson) apresentam as imagens representativas dos grupos CT, ISO, EtOH e EtOHapo tratados. Nestas, observa-se um maior acúmulo de vacúolos lipídicos no grupo de igual quantidade calórica ao EtOH. Esses resultados demonstraram que o consumo crônico alcoólico leve foi capaz de induzir apenas a microesteatose.

**Tabela 3.** Estadiamento histopatológico para modelo animal de esteatohepatite avaliado através das lâminas de hematoxilina-eosina e tricromo de Masson dos animais C57Bl/6 tratados por 14 semanas em dieta alcoólica e apocinina.

Item	Score	CT	ISO	EtOH	EtOHapo	p
Esteatose (grau)						
<5%	0	100% (7/7)	28,57% (2/7)	77,8% (7/9)	100% (9/9)	0,175
5%-33%	1	-	14,3% (1/7)	11,1% (1/9)	-	
33%-66%	2	-	28,57% (2/7)	11,1% (1/9)	-	
> 66%	3	-	28,57% (2/7)	-	-	
Localização (Padrão de distribuição)						0,065
Zona 3	0	-	-	44,5% (4/9)	88,9% (8/9)	
Zona 1	1	-	28,57% (2/7)	33,3% (3/9)	11,1% (1/9)	
Azonal	2	-	71,43% (5/7)	22,2% (2/9)	-	
Panacinar	3	-	-	-	-	
Esteatose microvesicular					**	< 0,01
Ausente	0	-	14,3% (1/7)	22,2% (2/9)	100% (9/9)	
Presente	1	-	85,7% (6/7)	77,8% (7/9)	-	
Fibrose						0,5
Ausente	0	85,7% (6/7)	-	44,5% (4/9)	88,9% (8/9)	
Perisinusoidal ou periportal	1	14,3% (1/7)	28,57% (2/7)	33,3% (3/9)	11,1% (1/9)	
Leve, zona 3, Perisinusoidal	1A	-	-	22,2% (2/9)	-	
Moderada, zona 3, Perisinusoidal	1B	-	-	-	-	
Portal/Periportal	1C	-	14,3% (1/7)	-	-	
Perisinusoidal e Portal/Periportal	2	-	42,85% (3/7)	-	-	
Fibrose difusa	3	-	-	-	-	
Cirrose	4	-	-	-	-	
Inflamação						0,5
Inflamação lobular						
Ausente	0	85,7% (6/7)	28,57% (2/7)	88,9% (8/9)	77,8% (7/9)	
<2 focos (400x/campo)	1	14,3% (1/7)	42,85% (3/7)	11,1% (1/9)	22,2% (2/9)	
2-4 focos (400x/campo)	2	-	28,57% (2/7)	-	-	
>4 focos (400x/campo)	3	-	-	-	-	
Microgranulomas						
Ausente	0	100% (7/7)	100% (7/7)	100% (9/9)	88,9% (8/9)	
Presente	1	-	-	-	11,1% (1/9)	
Grandes Lipogranulomas						
Ausente	0	100% (7/7)	100% (7/7)	100% (9/9)	100% (9/9)	
Presente	1	-	-	-	-	
Inflamação Portal						
Ausente	0	100% (7/7)	14,3% (1/7)	100% (9/9)	100% (9/9)	
Mínima - grande	1	-	85,7% (6/7)	-	-	
Injúria celular						
Balonização celular						0,71
Ausente	0	100% (7/7)	14,3% (1/7)	77,8% (7/9)	77,8% (7/9)	
Muitas células	1	-	28,57% (2/7)	11,1% (1/9)	22,2% (2/9)	
Muitas células/balonização predominante	2	-	57,14% (4/7)	11,1% (1/9)	-	
Corpos acidófilos						
Ausente a raro	0	100% (7/7)	51,14% (4/7)	100% (9/9)	100% (9/9)	
Muitos	1	-	42,85% (3/7)	-	-	
Macrófagos pigmentados						
Ausente a raro	0	100% (7/7)	100% (7/7)	100% (9/9)	100% (9/9)	
Muitos	1	-	-	-	-	
Megamitocôndria						
Ausente a raro	0	100% (7/7)	57,14% (4/7)	88,9% (8/9)	100% (9/9)	
Muitos	1	-	42,85% (3/7)	11,1% (1/9)	-	
Outros achados						
Corpúsculos de Mallory						
Ausente a raro	0	100% (7/7)	85,7% (6/7)	100% (9/9)	100% (9/9)	
Muitos	1	-	14,3% (1/7)	-	-	
Núcleo glicogenado						
Ausente a raro	0	100% (7/7)	85,7% (6/7)	100% (9/9)	100% (9/9)	
Muitos	1	-	14,3% (1/7)	-	-	
Classificação de diagnóstico					**	< 0,01
Normal	0	100% (7/7)	-	33,33% (3/9)	100% (9/9)	
Normal (limítrofe)	1	-	28,57% (2/7)	33,33% (3/9)	-	
Esteatose	2	-	28,57% (2/7)	33,33% (3/9)	-	
Esteatohepatite	3	-	42,86% (3/7)	-	-	

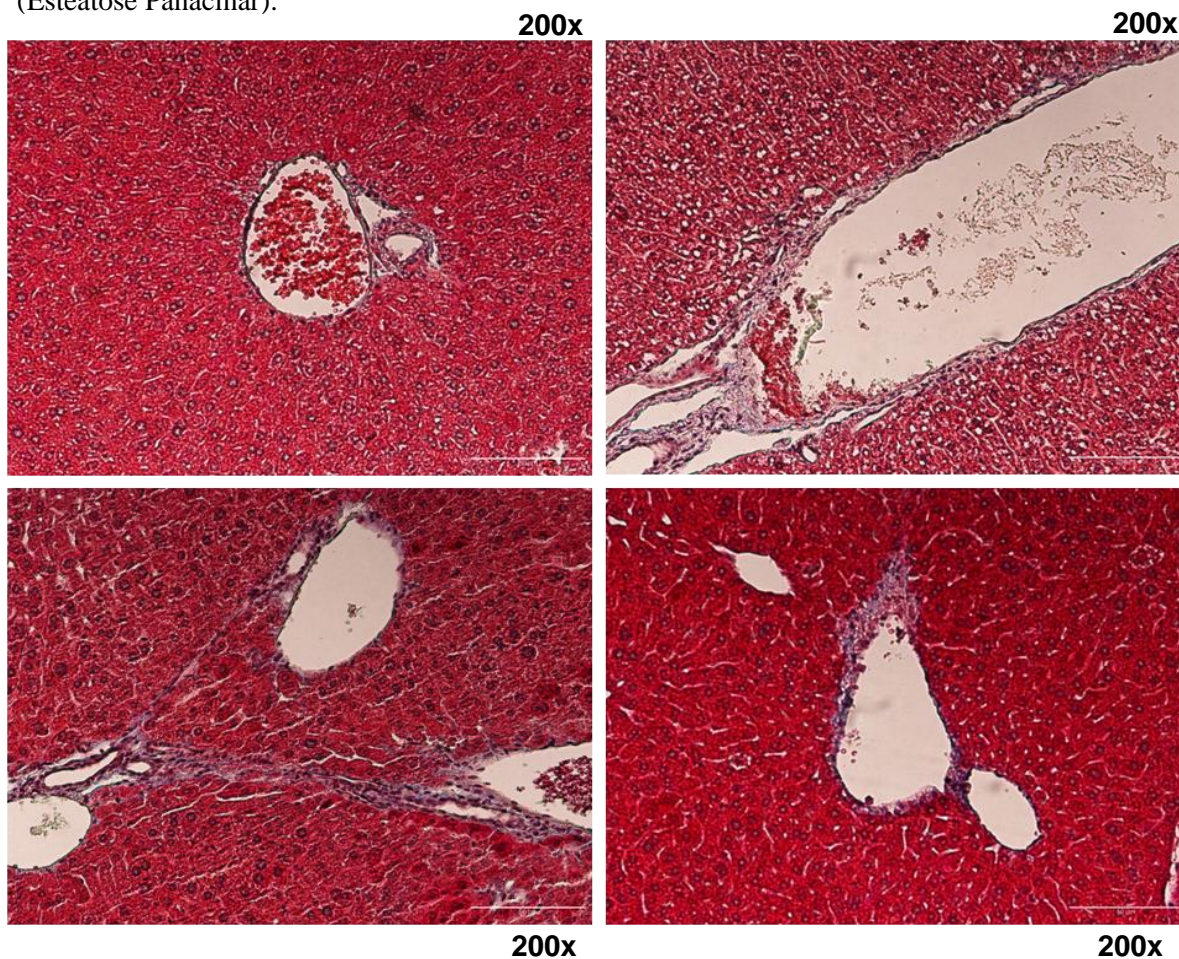
Os valores são apresentados em porcentagem e o número de camundongos com diagnóstico para doença hepática alcoólica (DHA) e o número de camundongos por grupo estão indicados entre parênteses. Teste exato de Fisher [\*\* EtOH vs. EtOHapo].

**Figura 17:** Secções histológicas de fígado (4-6µm) coradas em H&E dos C57BL/6 tratados por 14 semanas com dieta líquida alcoólica – água mineral (CT; a), sacarose [290,5g/l] (ISO; b) e solução etílica 20% v/v (EtOH; c) e solução 20% de etanol + apocinina (50mg/kg; d). Aumento de 400x. MO. As fotomicrografias representam os achados histológicos mais representativos de cada grupo. Observa-se nas figuras as áreas zonais 3 do lóbulo hepático, próximas a veia centrolobular. A figura **a) CT** apresenta padrão normal para arranjo em cordões de hepatócitos (corados em rosa e núcleo celular arroxeadado) com leve espaçamento do espaço maciça sinusoidal, com raros vacúolos lipídicos; a figura **b) ISO** apresenta padrão bastante alterado do parênquima hepática, com alto desarranjo celular e presença maciça de micro e macrovacúolos, presença de células polimorfonucleares, possivelmente de neutrófilos (setas pretas); a figura **c) EtOH** apresenta microvacúolos de lipídeos e leve espaçamento do espaço sinusoidal, marcada por leve desarranjo dos cordões de hepatócitos; e a figura **d) EtOHapo** apresenta um leve desarranjo parenquimal com presença de poucos vacúolos lipídicos.





**Figura 18:** Secções histológicas (4-6µm) coradas em tricromo de Masson dos C57BL/6 tratados por 14 semanas com dieta líquida – água mineral (CT;a), sacarose [290,5g/L] (ISO; b) e solução etílica 20% v/v (EtOH; c) e solução de etanol 20% + Apocinina (50mg/kg; d). Aumento 200x. MO. A figura representa as áreas zonais 1 do lóbulo hepático e o espaço porta hepático, em detalhe a tríade portal (TP). Marcado em vermelho o parênquima hepático e em azul, evidenciando a deposição de colágeno tipo I. A figura **a) CT** apresenta leve deposição de colágeno tipo I; a figura **b) ISO, c) EtOH** e **d) EtOHapo** apresenta fibrose periportal e perisinusoidal. Observa-se também na figura b, grupo ISO, a presença de microvacúolos (Esteatose Panacinar).



## 6. DISCUSSÃO

Nos parâmetros gerais analisados de desenvolvimento do modelo crônico etílico a 20% associado à apocinina (acetovanilona, 4-hidróxi-3-metóxi-acetofenona), este foi o fármaco de escolha para intervenção frente ao consumo etílico, caracterizando um modelo para alcoolismo crônico de 14 semanas em dose moderada (Solução etanólica 20%; 157,8 g/L). Assim, este estudo é focado na interação da apocinina a um clássico xenobiótico para estudo de um modelo animal de possível estresse oxidativo e de esteatohepatite.

Neste contexto, considerando-se a eficácia em diminuir danos oxidativos pela exacerbção da atividade do complexo multienzimático NADPH oxidase (Vejražka, Míček & Štípek, 2005) e aos efeitos da exposição crônica ao possível estresse oxidativo, foi testado o efeito da dose de 50 mg/kg de apocinina como intervenção ao uso concomitante do etanol (Tang et al, 2007; Kim et al, 2010), com o objetivo de avaliar os possíveis efeitos da apocinina. Neste trabalho, tanto o etanol como este associado à apocinina, apontam como substâncias capazes de promover o aumento da sensibilidade à insulina com promoção à diminuição da adiposidade e do peso corporal. Além disso, o uso da apocinina associada ao etanol foi capaz de reduzir danos hepáticos por acúmulo de lipídios, reduzindo assim, o processo de formação da esteatose em camundongos machos C57BL/6, tratados cronicamente com solução etílica. Os dados obtidos ainda mostraram que esse modelo apresentou manutenção do consumo leve durante todo o tratamento. Caracterizando esse modelo de consumo líquido voluntário para um modelo murino de consumo leve. Juntos, o etanol e apocinina não afetaram o perfil de desenvolvimento e o crescimento dos animais tratados pelo período de 14 semanas.

A avaliação do peso corporal apresentou redução estatisticamente significativa entre os grupos ao final do tratamento de 14 semanas, sendo verificada essa redução a partir da 13ª semana (CT e ISO vs EtOHapo,  $p < 0,01$  e  $p < 0,05$ ), além do ganho de peso para os grupos EtOH e EtOHapo que se mostrou significativamente reduzido ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo CT. Em conjunto, esses dados sugerem que o etanol promoveu um menor ganho de peso corporal e que a adição da apocinina intensificou essa resposta.

O parâmetro de consumo energético avaliado a partir do fornecimento das dietas líquida de água mineral (CT), sacarose 290,5 g/L (ISO), solução etanólica a 20% (EtOH) e solução etanólica + 50 mg/kg de apocinina e do consumo energético total, apresentaram

consumo geral de calorias distintos entre si. O consumo de ração e calorias totais ingeridas, vistos na tabela 02, foi verificado como sendo maior pelo grupo ISO, controle positivo às calorias ingeridas pelos grupos que consumiram etanol. Este consumo foi significativamente maior neste grupo do que quando comparado ao controle em que foi fornecida água mineral, e representa aproximadamente 50% de calorias a mais quando comparado ao CT e ao EtOH ( $p < 0,001$ ). Em relação ao grupo EtOHapo, esta diferença foi superior a 34% da energia diária ( $p < 0,01$ ).

Esse perfil de consumo demonstrado refletiu mudanças no peso bruto (não apresentado) e relativo dos tecidos adiposos pesados. Os resultados obtidos mostram uma redução do peso absoluto do tecido adiposo epididimal e perirenal, além da redução do peso relativo deste último tecido. Ademais, houve diminuição significativa estatisticamente no peso relativo intestinal do grupo ISO ( $p < 0,05$ ) em relação ao peso intestinal do grupo EtOHapo ( $p < 0,05$ ). Entretanto, não houve alteração de peso hepático relativo.

A literatura descreve que há uma estreita correlação entre as dimensões do tubo digestivo, tamanho do corpo e o tipo de dieta consumida (Sevens & Hume, 1995). Isso conduz a uma inadequação da relação gastroenterocorpórea e acarreta a uma progressiva diminuição das dimensões intestinais, além das alterações hepáticas em humanos (Santoro, 2005a). No entanto, o enriquecimento das dietas em calorias e o favorecimento de alimentos processados e refinados selecionam negativamente o intestino hipertrófico. Situação muito comum observada, quando comparados pacientes obesos submetidos à cirurgia de *bypass* gástrico, em oposição aos caquéticos, que possuem uma clara hipotrofia (Santoro, 2005b).

A explicação para tal fenômeno está baseada no trofismo da mucosa intestinal, relacionada à sinalização do trato digestivo superior (estômago) e a presença de nutrientes em território baixo (intestino distal) alterada. A má sinalização induzida por alimentos hipercalóricos que são logo absorvidos pelo intestino proximal impede que o processo de digestão chegue ao intestino distal. Isso promove a desregulação da secreção dos hormônios gástricos, a citar o Peptídeo-1 semelhante ao glucagon (GLP-1), Peptídeo-2 semelhante ao glucagon (GLP-2), o Peptídeo pancreático Y (PYY) e oxintomodulina (Drucker, 2007; Santoro, 2005a), assim o estado de satisfação alimentar é retardado pelo hipotálamo, o que eleva a hiperfagia. Ocasionalmente, principalmente, a maior secreção de GLP2, forte indutor de crescimento epitelial intestinal que, por sua vez, conduz a hiperplasia e hipertrofia do órgão (Verdam et al, 2011). O interessante a se destacar neste presente estudo foi a não-alteração do

peso tecidual hepático e intestinal dos grupos em relação ao CT, entretanto, houve uma redução do peso intestinal do grupo ISO em relação ao grupo EtOHapo.

O consumo alcoólico visto sobre o parâmetro de peso corporal, ainda é um paradoxo (Wannamethee & Shaper, 2003). Estudos sugerem que as calorias consumidas advindas do etanol são menos eficientes para uso metabólico do que as calorias provindas de outras fontes nutricionais (Klesges et al, 1994; Addolorato et al, 1998). E ainda, o álcool favorece o aumento no despendimento energético e na termogênese (Mattes, 2006), por conseguinte, também favorece a utilização de lipídeos por favorecer a degradação de triglicerídeos do tecido adiposo periférico a partir da supressão da ação antilipolítica da insulina (Kang et al, 2007). Outra via que pode explicar a modulação do peso corporal, é que a energia fornecida pelo álcool não é estocável, mas logo metabolizada, em razão de preferência (Rocha et al, 2010). Quando comparada às outras fontes nutricionais e ainda assim, diminui a oxidação de lipídios hepáticos (Murgatroyd et al, 1996; Sonko et al, 1994). Finalmente, menores níveis séricos de glicose plasmática e de insulina durante o consumo leve a moderado de bebidas alcoólicas reduzem de maneira significativa a lipogênese *de novo*, especialmente, no tecido adiposo (Begrache et al, 2006; Wang et al, 2004).

Em um estudo utilizando camundongos deficientes para leptina (*ob/ob*) e o tipo selvagem C57BL/6, verificou-se a diminuição do ganho de peso nos animais obesos. O que não ocorreu nos animais controle, quando tratados por seis meses com uma dose moderada alcoólica (21 g/kg durante 6 meses) (Fromenty et al, 2009).

A redução de ganho de peso corporal, em geral, é associada a uma melhora na sensibilidade à insulina e menores níveis de glicose de jejum. No presente estudo, esses perfis foram apresentados pelos animais tratados durante as 14 semanas de dieta etílica. Nos testes de tolerância à glicose e de sensibilidade à insulina realizados no presente estudo, observou-se que os animais expostos ao tratamento alcoólico leve tanto apresentaram boa tolerância à glicose como uma maior sensibilidade à insulina. Neste cenário, a literatura descreve que o tratamento crônico alcoólico nestas doses melhoram esses parâmetros, pois elevam a secreção de adiponectina (Fromenty et al, 2009; Imhof et al, 2009), diminuem o ganho do peso corporal e favorece o menor teor de gordura corporal (Hong et al, 2009). Além disso, adicionam um fator positivo de sensibilidade à insulina sobre o componente hepático (Dunn, Xu & Schwimmer, 2008).

Estudos realizados em humanos demonstram que a administração em grau leve a moderado de etanol promove respostas benéficas ao sistema cardiovascular, além de promover efeito na redução da glicemia em diabéticos (Gigleux et al, 2006; Ajani et al, 2000). Demais, promove a melhora da função endotelial (Suzuki et al, 2009), além de outros mecanismos envolvidos que estão relacionados a diminuição dos níveis da proteína C reativa (PCR), dos níveis séricos de HDLc e de ácidos graxos circulantes (Imhof et al, 2004).

Foi notável o maior consumo de líquidos e de calorias totais durante todo tratamento pelo grupo ISO, grupo este um controle positivo às calorais provindas da solução etílica. A combinação da ração mais um carboidrato adicional fornecido através de uma solução simples de sacarose *ad libitum* foram eficientes para o estoque energético e promoveu o ganho de peso nesses animais. Resultados obtidos nesse grupo experimental o qualificam para as características de um modelo barato e de fácil avaliação para desenvolvimento da síndrome metabólica, contrários aos resultados obtidos pelos animais que consumiram apenas soluções etílicas.

O grupo ISO teve livre acesso a dieta padrão através de ração comercial e dieta líquida unicamente de solução de sacarose, conforme descrito no tópico referente à metodologia. Esse resultado, em parte, deve-se à alta palatabilidade do carboidrato oferecido e o contínuo estímulo ao comportamento da sede através da ativação de células do órgão fornical e vascular da lâmina terminal do hipotalâmico pelo estado de hiperosmolalidade estabelecido pela dieta doce (Antunes-Rodriguez et al, 2004; Shi et al, 2010). Dietas como essas promovem voluntária hiperfagia, resultando em ganho de peso, aumento da adiposidade visceral e parâmetros pré-diabéticos, tais como intolerância à glicose e insensibilidade à insulina (resultados apresentados pelo grupo), além do trofismo intestinal, citado anteriormente.

A exemplo, as dietas de cafeterias que produzem efeitos hedônicos, ansiogênicos e alterações homeostáticas em longo prazo, diretamente correlaciona-se com características típicas da obesidade humana (Johnson & Kenny, 2010). O que se pode sugerir que os resultados obtidos aqui, neste trabalho, são resultados da forma energética fornecida e dos efeitos da sacarose e o etanol sobre os principais sítios metabólicos, a saber, o fígado, tecido adiposo e intestino delgado.



A literatura descreve que o efeito contínuo do etanol sobre um organismo biológico ocasiona elevação da pressão arterial (Tomson & Lip, 2006). Neste trabalho, para a pressão arterial sistólica (PAS), avaliada durante as doze primeiras semanas de tratamento etanólico, não foi observado mudança significativa entre os grupos durante a aplicação do protocolo experimental. A resposta da administração de apocinina na dose de aproximadamente 50 mg/kg por via oral, um inibidor do complexo NADPH oxidase, é descrita produzir efeitos positivos nesta dose e também em doses maiores (Kahles et al, 2010). No entanto, no protocolo aplicado no presente trabalho não se observou alteração nos níveis da PAS e FC dos animais EtOHapo. Assim, sugere-se que o volume de etanol fornecido e/ou o tempo de administração deste não foram capazes de induzir alteração nestes parâmetros cardiovasculares da PAS e da FC. Somando-se a isso, a dose de 50 mg/kg não foi capaz de diminuir a PAS ao final do tratamento quando comparada ao tempo basal.

Corroborando com esses dados, foi observada resposta semelhante em ratos, utilizando-se do tratamento crônico do etanol associado à apocinina em um período de dois a três meses. Os autores discutem que, apesar de não ter havido mudanças significativas na pressão arterial sistólica, a adição da apocinina ao etanol promoveu melhora da vasodilatação de arteríolas piiais e diminuição na produção de ânions radicais superóxido (Sun et al, 2006). Em estudo realizado por Ceravolo et al (2007) utilizando apenas apocinina na água de beber por duas semanas, também demonstrou resultado parecido. Os autores observaram a inalteração da pressão arterial sistólica avaliada por plestimografia de cauda em ratos com relação ao seu controle e também aos níveis anteriores ao tratamento da apocinina. Observou-se nesse mesmo estudo, uma diminuição na expressão do receptor B1 para bradicina e na produção de ânions radicais superóxido em anéis de aorta. Sugerindo-se que a supressão ou menor atividade do complexo NADPH oxidase nesses vasos e que essa intervenção não foi capaz de alterar a PAS, porém outros parâmetros foram favorecidos positivamente, como os já supracitados nesses trabalhos.

Husain et al (2004) e Husain (2007) demonstraram em ratos Fisher tratados cronicamente com solução alcoólica a 20% (4 g/kg; gavage) por 12 semanas, o aumento da PAS, a partir da sexta semana e aumento da PAD, a partir da oitava semana de tratamento. Na aorta, houve baixa regulação de VEGF, depleção de  $\bullet$ NO, aumento da peroxidação lipídica e de proteínas carboniladas, além da elevada atividade da NADPHox. Nesse contexto, esses dados podem explicar a não alteração temporal verificada no modelo apresentado neste

trabalho. Além disso, a forma de oferecimento do etanol, dado livremente na água de beber e o uso do próprio modelo animal utilizado possam ter influenciado para a obtenção dessa resposta.

Os resultados apresentados neste presente trabalho podem ser consequentes ao baixo consumo alcoólico durante todo o tratamento, o que não provocou a elevação da PAS e ainda reduziu os seus valores observados anteriores ao tratamento (valores basais) (Estruch, Coca & Rodicio, 2005). Em geral, roedores apresentam aversão ao etanol e a bebidas alcoólicas, consequentemente, tendem a consumir baixos volumes da bebida quando oferecida livremente (Lieber, Jones & DeCarli, 1965; Piano et al, 2001). Alguns autores mostram características positivas e benéficas observadas em estudos epidemiológicos para o uso habitual de bebidas alcoólicas entre as populações. Cita-se a busca por respostas para explicar o ‘paradoxo francês’, onde este se refere ao hábito dietético rico em gorduras pela população francesa, mas, associado a este, os franceses apresentam baixos índices de mortalidade por doenças coronarianas. E comparativamente a outras populações ocidentalizadas, o povo francês apresenta um baixo índice de obesidade (Renaud et al, 2004; Kerr et al, 2005).

O estudo de coorte realizado por Renaud et al (1998) da Universidade de Bordeaux, foi o principal trabalho a definir o efeito protetor das bebidas alcoólicas em doses moderadas. Esse estudo de seguimento envolveu 34.014 homens de todas as classes sociais, com faixa de idade de 40 - 60 anos da região leste francesa. Foi verificado que o consumo moderado de vinho (2 a 3 taças/dia) está diretamente associado a redução de 24-31% da mortalidade por todas as causas, tanto em fumantes, não-fumantes e ex-fumantes. Salientando-se, no trabalho supracitado, um efeito positivo do consumo de bebidas contendo álcool em reduzir mortalidade. Neste cenário, os dados obtidos por este modelo justificam os resultados positivos aqui apresentados. Através da extração de lipídios do fígado e a análise do perfil plasmático de triglicerídeos e colesterol total obtido. A partir desses dados, observou-se apenas a elevação estatisticamente significativa dos níveis de triglicerídeos hepáticos para os grupos que receberam dieta líquida de sacarose, etanólica e etanólica mais apocinina, além do teor lipídico/peso hepático em gramas. Dados da literatura sugerem que o consumo alcoólico em altas doses promove a desregulação sistêmica dos lipídios circulantes, porém como o consumo espontâneo das bebidas contendo etanol do modelo em questão foi baixo. Este, por sua vez, pode ter evitado que grandes alterações possam ter ocorrido no perfil lipídico circulante (Sozio & Crabb, 2008).

Em estudo realizado por Yin et al (2007), demonstrou-se alteração no perfil da expressão de genes intra-hepáticos envolvidos na regulação da lipogênese em um modelo de resposta alcoólica aguda (dose 0,5 a 5 g/kg) por via intra-gástrica em camundongos ICR (**Imprinting Control Region**, linhagem de camundongos, que apresenta a expressão apenas de um dos alelos, ocorrendo o silenciamento do outro). Esse estudo envolveu a identificação de 6.286 genes significativamente modulados pelo etanol e que atuam em uma grande variedade de processos biológicos, entre eles, destacam-se processos de sinalização e transdução celular, metabolismo de ácidos nucleicos e de proteínas, além do aumento da expressão de genes associados com a síntese de ácidos graxos como os elementos reguladores de esteróides (SREBP1), a ATP citrato liase (Acl), a ácido graxo sintetase (FAS). Ainda nesse mesmo estudo, verificou-se na avaliação histológica hepática, a elevação significativa de lipídios teciduais e presença esteatose leve.

O que se pode inferir que mesmos em baixas quantidades, o etanol é capaz de provocar alteração na expressão de genes envolvidos em processos lipogênicos e na desregulação do metabolismo lipídico hepático como verificado nos resultados do presente trabalho. E mesmo não apresentando mudanças estatisticamente significativas de acúmulo lipídico, especula-se que possam acontecer mudanças na expressão de genes que regulam o metabolismo desses animais. Contudo, os dados aqui apresentados não permitem uma maior explanação acerca desse tema. Em trabalho anterior realizado por nosso laboratório, utilizando-se um modelo alcoólico semelhante, porém tratados por 12 semanas, uma resposta semelhante foi encontrada, evidenciado uma inalteração do perfil lipídico dos animais tratados cronicamente por via oral espontânea em solução etanólica a 20% (Gomes, Souza & Rabêlo, 2009).

Seiva et al (2009) deduz que alterações do perfil lipídico e do estresse oxidativo está relacionado aos efeitos adversos promovidos pelo alcoolismo sobre o metabolismo energético e relaciona-se especificamente sobre o alto despendimento energético e mudanças calorimétricas. No entanto, mudanças sistêmicas apenas se apresentaram presentes quando o consumo etílico ultrapassa uma quantidade mínima limítrofe de etanol ou uma combinação de outros fatores para provocar alterações significativas sobre o perfil enzimático oxidativo e sobre os níveis de peroxidação de membranas (Somani et al, 1996; Tsukamoto et al, 1996).

Corroborando com esses dados, estudo realizado por Husain & Somani (1997), descreve que 1,6 g/kg de etanol foram necessários para alterar o sistema antioxidante hepático

e plasmático em ratos, no parâmetro referente à atividade da SOD, CAT, GPx e GR e suas razões, e ainda, obteve resposta para níveis não-alterados de MDA. Schloff et al (1999) também confirma esses resultados, utilizando-se de um modelo agudo similar (única dose), de resposta dose-tempo dependentes para o etanol, em que só se obteve alterações no balanço redox enzimático a partir da dose de 2 g por via oral forçada (gavage). Esses dados são condizentes com os resultados apresentados neste trabalho utilizando-se camundongos C57BL/6. Os resultados aqui apresentados mostram que não ocorre alteração na atividade da CAT e SOD hepática e nem da razão da CAT/SOD (dados não-apresentados) dos animais tratados com etanol e etanol mais apocinina, além da redução hepática de peroxidação lipídica.

Neste contexto, estudos prévios indicam que altas doses de etanol (5 g/kg diariamente) são capazes de provocar depleção do DNA mitocondrial, um marcador de dano à fosforilação oxidativa e ao aparecimento de megamitocôndrias, além de alterações na cadeia transportadora de elétrons. No entanto, baixas doses (2,5 g/kg) etílicas não provocam alterações nos níveis de peroxidação lipídica em camundongos C57BL/6 e ainda, não induz mudanças no estado antioxidante plasmático (Robin et al, 2005; Larosche et al, 2009). Possivelmente, porque a elevação da peroxidação lipídica acontece em algumas situações, já bem conhecidas, como 1) a exacerbação da atividade da CYP450, 2) diminuição dos níveis totais de glutathione e  $\alpha$ -tocoferol, 3) diminuição da atividade da GPx, 4) uma carência adaptativa da elevação da atividade da glutathione transferase (GST), e, por fim, 5) a oxidação do LDL.

Embora a administração de etanol induza a geração de EROs pela via induzível pela CYP450, a elevação da peroxidação lipídica hepática não é um achado constante depois do consumo crônico de etanol, e isso, possivelmente, pode indicar um processo adaptativo para situações de estresse constante (Nordmann, Ribière & Rouach, 1992). Numerosos estudos que se utilizaram de modelo nutrição alcoólica mostram que não há sucesso em induzir a elevação da peroxidação lipídica (Kawase, Kato & Lieber, 1989 & Azzalis et al, 1995). A citar, o trabalho realizado por Robin et al (2005) demonstrou que em camundongos geneticamente obesos, o etanol em dose moderada (2,5 g/kg) foi capaz de induzir a apoptose de hepatócitos sem aumento significativo no estresse oxidativo através da elevação das atividades das principais vias de indução de formação de radicais livres, como o da NADPH oxidase.

A SOD tem um papel fundamental na defesa contra as EROs geradas no organismo durante a respiração aeróbica e pelo metabolismo de componentes exógenos (Li et al, 2004). Previne a formação de ONOO<sup>-</sup> por conversão do 'O<sub>2</sub><sup>-</sup> para O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e esta última substância é removida pela ação da CAT e GPx (Li et al, 2004, Ozaras et al, 2003). A SOD é importante na prevenção da peroxidação lipídica através da competição com 'O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Estes eventos antecipam a reação com os ácidos graxos insaturados de membranas da célula (Ozaras et al, 2003). Sua ausência ou menor atividade pode ser associada ao aumento do dano hepático (Rouach et al, 1997) e, é acompanhada da evolução para hepatocarcinoma tanto em humanos quanto em camundongos (Elchuri et al, 2005; Muller et al, 2006). No presente trabalho, as atividades enzimáticas da SOD e da CAT não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos, o que se pode sugerir que suas atividades não foram esgotadas pela produção do 'O<sub>2</sub><sup>-</sup> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, respectivamente, e/ou que esteja existindo um processo adaptativo ao consumo etanólico e que de alguma a atividade da NADPH oxidase não esteja exacerbada.

A importância da SOD também é apresentada em trabalho realizado por Kessova et al (2003). Neste estudo foi demonstrado em camundongos (machos e fêmeas) C57Black/129SV homólogos recessivos para a forma da SOD1 (isoforma dependente de cobre e zinco, presente no citoplasma das células e no espaço extracelular), há um aumento do estresse oxidativo, elevação de proteínas carboniladas, do ONOO<sup>-</sup>, da peroxidação lipídica, e a diminuição da SOD2 (isoforma dependente de manganês, presente na mitocôndria) e GSH, além da redução do ATP celular, quando o etanol foi fornecido em dieta líquida para consumo espontâneo e representando 10% do total de calorias e com dose equivalente a 7 g/kg/dia.

Em contraste, Curry-McCoy et al (2010) realizou estudo similar com camundongos homólogos recessivos para a SOD1 (etanol representando 20% do total de calorias por 24 dias, dada de forma espontânea) e demonstraram uma redução da atividade da ADH e da CYP2E1, e conseqüentemente, redução no metabolismo do etanol. Estes resultados apresentaram respostas atípicas ao seu efeito, incluindo a ausência de esteatose (diagnóstico), porém com elevação da peroxidação lipídica, e ainda contrastando com os elevados níveis tanto da GSH como da GSSG. Estes dados mostraram que o consumo moderado de etanol não induz alterações significativas no desenvolvimento da esteatose hepática, mesmo para camundongos tratados cronicamente e com deleção gênica para uma importante defesa, a SOD1. No entanto, quando estes animais são tratados com uma quantidade elevada (mais que

20% totais de caloriais) e diária de etanol ocorre dano tecidual hepático elevado e estresse oxidativo (Curry-McCoy et al, 2010).

Nos resultados obtidos no estadiamento histopatológico hepático, baseado em método de *scoring* semiquantativo para o estudo de achados clínicos e da história natural da NAFLD e a NASH desenvolvido por Brunt et al (1999) e ampliado por Kleiner et al (2005), foi o modelo de contagem utilizado, pois possui uma ampla descrição de achados histológicos para a identificação e diagnóstico da esteatohepatite da NAFLD/NASH e permite a sua aplicação para o estudo da ALD (porque esta apresenta características e similaridades de lesões hepáticas comuns e inclui a avaliação detalhada da esteatose, esteatohepatite, fibrose e cirrose).

Esse trabalho foi realizado, em conjunto, com uma patologista experiente e objetiva avaliar e diagnosticar o estado hepático dos camundongos do modelo etanólico de consumo leve tratados por 14 semanas em dieta alcoólica associada à apocinina. Não foi verificado em nenhum dos animais tratados com etanol mais apocinina o diagnóstico de esteatose ou esteatohepatite, segundo diagnóstico patológico. No entanto, o grupo EtOH que recebeu apenas etanol desenvolveu a esteatose. Sugerindo que a apocinina evitou esse processo, apresentando um efeito protetor sobre esse agravo hepático. Apesar de não existirem ainda trabalhos na literatura que descrevam a melhora deste 1º *hit* através do uso da apocinina associada ao etanol modelo animal semelhante. É ampla a descrição do efeito do fármaco em questão na proteção sobre processos inflamatório em que o estado de esteatohepatite é diminuído com o uso da apocinina (Meng et al, 2011).

A esteatose é um achado frequente em biópsias hepáticas. No entanto, ela não está necessariamente presente na ALD, porém é um importante fator para o diagnóstico da doença hepática de origem não-alcoólica (Tannapfel et al, 2011). O padrão de normalidade para a maioria amostral deste trabalho sob intervenção da apocinina (50 mg/kg) foi capaz de proteger, de fato, o fígado dos camundongos contra os danos causados pelo etanol para o desenvolvimento da esteatose. No entanto, não diminuiu a quantidade de microvacúolos. Caracterizado pela presença de esteatose microvesicular. Em contrapartida, esta foi a principal característica dos animais tratados com etanol. O grupo EtOH não apresentou o desenvolvimento da hepatite, porém desenvolveu esteatose em graus variados nos diversos componentes do grupo, desde a presença limítrofe de vacúolos até a um estado mais avançado com presença também de macrovacúolos.

No entanto, alguns estudos descrevem a participação enzimática das paraoxonases (PON) e seu envolvimento na diminuição de lipídios e diminuição de dano oxidativo cardiovascular e hepático (Marsillach et al, 2008). As PONs (isoformas PON1, PON2 e PON3, arildiaquilfosfatases) são esterases plasmáticas dependentes de  $Ca^{+2}$ , responsáveis pela hidrólise de fosfolipídios específicos oxidados, produtos enzimáticos e não enzimáticos do ácido aracdônico e ácido docosahexaenóico e N-acil-homocisteína (Draganov et al, 2005). Especificamente, a PON1 é exclusivamente sintetizada pelo fígado e pode ser regulada tanto geneticamente quanto por dieta (Kelso et al, 1994; Liviev et al, 1997). Sua baixa atividade está relacionada a situações de hipercolesterolemia, diabetes, doenças cardiovasculares e em hepatopatias de origem alcoólica e não-alcoólica (Mackness et al, 1991; Ruiz et al, 1995; Ferré et al, 2006; Marsillach et al, 2007; Killic et al, 2005).

Segundo Aviram et al (1998 e 1999), apesar da PON1 proteger da oxidação partículas de LDL através de um ‘tampão biológico’ antecipando a interação com peróxidos lipídicos específicos. Ela é tempo-dependente da oxidação dessas partículas e inativada à medida que ocorre a oxidação das LDL, o que é inevitável em situação de desequilíbrio oxidativo. Contudo, quando avaliada sua atividade em paralelo com a presença dos polifenóis isoflavona glabridina ou quercitina e grupamentos sulfidrilas *in vitro*, sua atividade é preservada e acentua-se a remoção de adutos de LDL oxidados e peróxidos lipídicos.

Meilin, Aviram & Hayek (2009) descrevem em estudo para avaliar função da Paraoxonase 2 (PON2) utilizando macrófagos peritoneais deficientes para PON2, (MP-PON2<sup>0</sup>) e usando como controle células de camundongos C57BL/6 submetidos a condições de hiperglicemia (30 Mm), significativo aumento da biossíntese (2,6x) e acúmulo de triglicerídeos (3x), aumento da atividade do Diacilglicerol acetiltransferase 1 microsomal (DAGT1) em 60%, aumento do estresse oxidativo, avaliado através do estresse oxidativo celular em 25%, oxidação de LDL em 41% e da expressão de receptores para produtos finais glicosados em 18%. Porém, quando se utilizou da apocinina (50  $\mu$ M), o incremento da biossíntese, do acúmulo de triglicerídeos e da atividade da DGAT1 microsomal foram abolidos em ambiente hiperglicêmico. Os autores explicam que MP-PON2<sup>0</sup> apresentam estresse oxidativo elevado e está relacionado a atividade da NADPH oxidase, que por sua vez, a DGAT1.

A biossíntese de triglicerídeos nos macrófagos é regulada por múltiplas vias e enzimas. As DGATs têm atividades reguladoras sobre a síntese de triglicerídeos. A DGAT1

está relacionada aos valores basais de triglicerídeos celular e a DGAT2, com a síntese de triglicerídeos a partir do VLDL no fígado (Farese & Smith, 2000). A DGAT1 presente nas membranas dos macrófagos catalisa a formação de acetil-coA para diacilglicerol, passo chave para a síntese de estéres de glicerol. Em condição de estresse oxidativo, a atividade da DGAT1 é desregulada. Assim, sob a ausência da atividade da PON2, está presente o estresse oxidativo ocasionado pela exacerbação da NADPHox, no qual a atividade será inativada com o uso da apocinina.

Em trabalho realizado por Rao et al (2003), utilizando-se de modelo alcoólico humano e animal para estudo da atividade das PONs em situação de consumo leve a moderado e pesado. Foi observado no estudo com ratos Wistar-Furth machos que o consumo leve a moderado induziu o aumento da atividade plasmática e hepática de 20% a 25% e aumento dos níveis de mRNA das PON hepática em 59%, em contraste, no consumo pesado, houve diminuição da atividade plasmática e hepática em 25% e redução da expressão de mRNA em 51%. Já a atividade plasmática, em humanos (homens, 25 a 59 anos) com consumo leve a moderado, foi aumentada em 395% e diminuída em 45% aos consumidores pesados, respectivamente, comparadas com não-consumidores ou abstinentes ( $\geq 6$  meses) de bebidas alcoólicas. Significativamente, esse trabalho correlaciona os níveis de atividade plasmática e expressão de mRNA hepático da PON com o volume de etanol consumido e níveis de lipídios circulantes, principalmente de LDL colesterol que é elevado em alcoólicos, consequentemente na funcionalidade hepática (Croft et al, 1996).

Pode-se especular que a atividade preservada da PON1 hepática seja também um dos possíveis mecanismos presentes para explicar a inexistência do diagnóstico qualitativo para a esteatose nos animais tratados com apocinina no diagnóstico patológico. Visto que, nos resultados de lipídios hepáticos e na contagem de vacúolos não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos que consumiram etanol e etanol mais apocinina. No entanto, devido a ausência das atividades enzimáticas hepáticas da NADPHox, CYP2E1, GPx e da própria PON, além de tióis totais, não é possível afirmar seus comportamentos enzimáticos neste modelo alcoólico. Haja vista que esse é o primeiro modelo murino a avaliar os efeitos pressóricos e hepáticos para o alcoolismo crônico em uso concomitante ao um forte antioxidante e inibidor do complexo NADPHox em nosso laboratório e até a data atual, ainda não é descrito na literatura científica.



Esses dados estão em consenso com a quantificação de lipídios hepáticos obtidos pelo método de Folch, Lees & Sloane Stanley (1957). A quantificação de lipídios totais por peso tecidual e de triglicerídeos não se apresenta modificado nestes animais. Outro dado relevante é a preservação do componente hepático metabólico de sensibilidade à insulina, que se mostra neste, um perfil mais acentuado para o efeito dose-resposta, tanto para a sobrecarga de glicose quanto para a de insulina verificada nos testes tolerância e sensibilidade, respectivamente.

Em contraste, a intervenção oral de apocinina não produziu efeito em diminuir o número de vacúolos de triglicerídeos no grupo tratado concomitante com o uso do etanol, e que a dieta líquida em forma de carboidratos (forma direta de energia; grupo ISO). Entretanto, ainda assim, dietas ricas em sacarose provocam maior deposição de lipídios no fígado, do que um bem conhecido indutor de lesões hepáticas, o etanol, porém isto pode estar exatamente associada à quantidade consumida deste composto alcoólico e a capacidade de depuração hepática de xenobióticos. Segundo Wiśniewska-Kmypl & Wrońska-Nofer (1994), a oxidação do etanol em roedores é três vezes mais rápido do que em humanos (0,3 g/kg).

A esteatose hepática é caracterizada pelo acúmulo de lipídios em células ou no tecido. Todavia, quando em situação de equilíbrio e normalidade metabólica, isso não ocorre. Por ter papel chave no metabolismo, o fígado é o sítio de maior ocorrência de vacúolos de lipídios. Apesar do processo esteatótico, a princípio, apresentar-se benigno, a continuidade do uso de xenobióticos ou uma sobrecarga metabólica energética eleva a doença ao estágio mais avançado de cirrose (não diagnosticado nos animais em questão), quando ocorre perda da funcionalidade tecidual e uma descompensação metabólica sistêmica (Tannapfel, 2011).

Em oposição aos resultados deste trabalho, um estudo realizado por Kang et al, (2007, b) demonstrou em ratos que o consumo crônico alcoólico (álcool representou 36% do total de calorias) induz a resistência à insulina, sendo esta associada a supressão da produção de glicose hepática e diminuição da captação de glicose pelo tecido adiposo. Os autores observaram ainda que infiltração de macrófagos nos tecidos adiposos epididimal, subcutâneo, e estas foram responsáveis pela resistência insulina e alteração da expressão de adipocitocinas. Neste cenário, vários trabalhos descritos na literatura demonstram a existência de um efeito sinérgico do consumo alcoólico acentuado com envolvimento fisiológico duplo, tanto do fígado quanto do tecido adiposo periférico para resposta à regulação da glicose e o processo inflamatório sistêmico (Frayn, 2000; Kabir et al, 2005).

Em geral, distúrbios da função hepática e acentuada ativação do sistema imune desencadeiam o estresse tecidual hepático e prejudicam a sensibilidade à insulina e danos relacionados a tolerância à glicose. Associada à doença hepática crônica e a cirrose (Cnop et al, 2002). As concentrações de insulina, nessas situações, costumam ser elevadas, sugerindo um estado de resistência periférica, pois o etanol apresenta modulação sobre o ambiente hepático e aumenta a expressão de citocinas inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6, através do receptor TLR4 em células de Kupffer (Mandrekar & Szabo, 2009). No entanto, essas alterações só se apresentam no consumo elevado de etanol, o que parece não ter ocorrido neste estudo, pois estes animais apresentaram melhora na sensibilidade à insulina, sem alteração significativa para o processo inflamatório. Isso acontece, em geral, com redução de citocinas inflamatórias, apesar da desregulação do sistema imune inato.

Segundo pesquisa realizada por Pai et al (2005) nos Estados Unidos, que avaliou os riscos de doenças cardiovasculares associadas ao consumo alcoólico moderado, entre homens e mulheres, envolvendo uma amostra 1.432 pessoas, constatou-se que os marcadores inflamatórios TNF $\alpha$ , proteína C reativa (PCR) e IL-6 estão diminuídos no público que consome bebidas alcoólicas regularmente, quando comparados aos não-bebedores.

Em pacientes com doença hepática alcoólica, marcadores de peroxidação lipídica, tais como dienos conjugados, MDA, 4-hidroxinonal e F2-isoprostanos estão elevados (Meager et al, 1999). Estes componentes podem formar adutos protéicos em áreas de infiltração gordurosa, necrose focal e fibrose. Em humanos, o diagnóstico da esteatose está relacionado à presença de fibrose na zona 3 acinar. No caso específico deste trabalho, os baixos níveis encontrados de MDA sugerem também uma menor presença de fibrose nestes animais (Tiniakos, 2009).

O fígado é particularmente um órgão de risco a danos decorrentes do consumo alcoólico, devido principalmente, ao suprimento sanguíneo direto ao sistema porta do trato intestinal. O etanol é considerado o fator mais frequente da elevação das enzimas hepáticas. No entanto, estudos populacionais relacionam a elevação de marcadores de doenças hepáticas ao aumento concomitante do peso corporal (Lee, Ha & Christiani, 2001). Em estudo populacional realizado em população masculina japonesa apresenta que o consumo leve a moderado de bebidas alcoólicas diminui a prevalência da elevação da atividade da ALT, redução da prevalência da doença hepática gordurosa (Gunji et al, 2009) e melhora da sensibilidade à insulina (Fueki et al, 2007).

Os marcadores de atividade enzimática da AST e a razão AST/ALT se apresentaram significativamente diminuídos no grupo EtOHapo em comparação ao CT neste atual trabalho. No entanto, a atividade de  $\gamma$ -GT, FAL e LDH e níveis séricos de proteínas totais e albumina não se apresentaram estatisticamente alterados. A enzima AST é um marcador sensível para danos celulares mais profundos, e a ALT, uma enzima presente em grande quantidade no fígado, especificadamente no citoplasma dos hepatócitos, atua, principalmente, como marcador hepatocelular, pois existe primariamente no fígado (Coates, 2011). Assim, apresenta valores alterados mais rapidamente. Mudanças fisiológicas se apresentam rápidas quando em situação de necrose do hepatócito. Durante o estado de intoxicação por etanol, ela é menos sensível que a AST para detectar hepatite. Já a enzima  $\gamma$ -GT é um indicador para colestase ou obstrução biliar; a FAL é um marcador de infiltração inflamatória, colestase ou obstrução biliar, enquanto LDH pode indicar indícios de lesão celular, porém não é específico para dano hepático (*American Gastroenterology Association*, 2002). Como visto nos resultados deste trabalho, houve uma redução significativa da atividade plasmática da AST e da AST/ALT, o que descarta a hipótese desse modelo ter evoluído para ALD ou que tenha ocorrido outros distúrbios hepáticos significativos.

Em relação aos valores séricos de proteínas totais circulantes, essenciais para a manutenção da homeostase corporal, observa-se que altos níveis de etanol afetam tanto os valores protéicos presentes no fígado quanto os valores circulantes. Dessa forma, a razão de síntese e proteólise pode estar alterada. Esses eventos podem determinar tanto o peso do fígado quanto o teor protéico tecidual. Somando-se, a síntese e estoque de lipídios na esteatose aumentam o peso hepático, e associado ao aumento das lipoproteínas, contribuem para o teor protéico local. Neste contexto, resultados de inibição de síntese de proteínas, especialmente albumina, foram presentes em hepatócitos isolados (Wallin & Morland, 1987) e em modelo agudo *in vivo* roedor de nutrição alcoólica (Smith-Kielland et al, 1983).

Em humanos, no período pós-prandial, é descrito também que o consumo moderado inibe a síntese de proteínas de maneira aguda (De Feo et al, 1995). Embora nesse atual trabalho, a indução a dieta alcoólica crônica não foi evidenciado diferenças nos valores séricos e hepáticos de proteínas totais (dados não apresentados), além disso, os níveis de albumina não apresentaram alterados significativamente entre todos os grupos tratados o que implica o não comprometimento da função hepática dos animais.

Em conjunto, os dados aqui apresentados sugerem que, neste modelo roedor de cronicidade alcoólica, o consumo leve por 14 semanas não foi capaz de desregular o metabolismo lipídico sistêmico. Observa-se que os valores de triglicerídeos, colesterol e VLDL plasmáticos não foram alterados, apesar de haver uma elevação de triglicerídios hepáticos nos animais que receberam deita alcoólica. Além disso, não houve modificações no balanço enzimático antioxidante, e ainda, favoreceu a diminuição da peroxidação lipídica hepática e melhorou a resposta à sobrecarga de glicose. Evidenciando uma melhor sensibilidade à insulina, diminuição da adiposidade, e conseqüentemente menor ganho do peso corporal. Assim, sugere-se que a preservação do componente hepático foi fundamental para obtenção destes resultados e o efeito de dose-resposta da apocinina (acetovanilona) foi capaz de evitar o desenvolvimento da esteatose hepática neste modelo, sugerindo que este composto influenciou o componente lipídico hepático e possivelmente, houve um dano oxidativo e efeito citotóxico baixo neste modelo usando camundongos C57Bl/6.

Concluindo-se que a baixa alcoolemia e frequência de consumo por 14 semanas apresentaram-se positivas para os parâmetros de sensibilidade à insulina, possivelmente devido ao favorecimento do menor ganho de peso corporal e redução da adiposidade. Além disso, o acréscimo da apocinina ao consumo etanólico evitou o desenvolvimento da esteatose e reduziu a peroxidação lipídica hepática, sem alteração da atividade antioxidante enzimática da CAT e SOD.

## 7. CONCLUSÕES

- O tratamento crônico por 14 semanas com EtOH ou com este em associação com a apocinina melhoram os padrões metabólicos de tolerância à glicose e aumenta a sensibilidade à insulina com promoção da diminuição do ganho de peso corporal;
- O menor ganho de peso corporal pode estar envolvido em um processo de lipólise periférica que ocasiona o maior acúmulo de triglicerídeos hepático de forma a evitar a lipotoxicidade;
- O tratamento crônico etílico não provocou alteração da PAS;O tratamento etílico induziu a elevação dos lipídios hepáticos e de triglicerídeos;
- O estado de peroxidação lipídica é reduzido no tecido hepático dos animais tratados com etanol mais apocinina e não ocorre alteração do balanço Redox enzimático hepático, referente à SOD e CAT;
- O modelo crônico etílico a 20% de 14 semanas crônicas envolve menor comprometimento hepático, sem induzir alterações irreversíveis; produzindo o estado nos animais submetidos à dieta etílica forçada com presença de esteatose microvesicular.

## REFERÊNCIAS

- ADDOLORATO, G. et al. Three months of abstinence from alcohol normalizes energy expenditure and substrate oxidation in alcoholics: a longitudinal study. *The American Journal of Gastroenterology*. V. 93, p. 2476-2481. 1998.
- AJANI, U. et al. Alcohol consumption and risk of type 2 diabetes mellitus among US male physicians. *Archives of Internal Medicine*. V. 160, p.1025-1030. 2000.
- ALBANO, E. Oxidative mechanisms in the pathogenesis of alcoholic liver disease. *Molecular aspects of Medicine*. V. 29, p. 9-16. 2008.
- AMERICAN GASTROENTEROLOGY ASSOCIATION (AGA). AGA technical review on the Evaluation of liver chemistry tests. *Gastroenterology*. V. 123, p. 1367-1384. 2002.
- ANTUNES-RODRIGUEZ, J. et al. Neuroendocrine control of body fluid metabolism. *Physiological Reviews*. V. 84, p. 169-208. 2004.
- ARTEEL, G. Oxidant and antioxidant in alcohol-induced liver disease. *Gastroenterology*. V. 124, p. 778-790. 2003.
- AVIRAM, M. et al. Paraoxonase active site required for protection against LDL oxidation involves its free sulfhydryl group and is different from that required for its arylesterase/paraoxonase activities: selective action of human paraoxonase allozymes Q and R. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. V. 18, n.10, p.1617-1624.1998.
- AVIRAM, M. et al. Human for its arm paraoxonase (PON 1) is inactivated by oxidized low density lipoprotein and preserved by antioxidants. *Free Radical Biology & Medicine*. V. 26, n.7/8, p. 892-904. 1999.
- AVOGARO, A.;TIENGO, A. Alcohol, glucose metabolism and diabetes. *Diabetes & Metabolism Reviews*. V. 9, p. 129-146. 1993.
- AZZALIS, L. et al. Prooxidant and antioxidant hepatic factors in rats chronically fed an ethanol regimen and treated with an acute dose of lindane. *Free Radical Biology & Medicine*. V. 19, p. 147-159. 1995.
- BABIOR, B. NADPH oxidase: an update. *Blood*. V. 93, p. 1464-1476. 1999.
- BAILEY, S.;CUNNINGHAM, C. Contribution of mitochondria to oxidative stress associated with alcohol liver disease. *Free radical Biology & Medicine*. V. 32, p. 11-16. 2002.
- BARATTA, J. et al. Cellular organization of normal mouse liver: a histological, quantitative immunocytochemical, and fine structural analysis. *Histochemistry and Cell Biology*. V. 131, p.713-726. 2009.
- BATALLER, R.; BRENNER, D. Liver fibrosis. *The Journal Clinical Investigation*. V. 115, p. 209-218. 2005.

- BAUMANN, J.; GAULDIE, J. The phase acute response. *Immunology Today*. V. 15, p. 74-80. 1994.
- BAUTISTA, A. Chronic alcohol intoxication induced hepatic injury through enhanced macrophage inflammation protein-2 production and intracellular adhesion molecule-1 expression in the liver. *Hepatology*. V. 25, p.335-342. 1997.
- BERDARD, K.; KRAUSE, K. The nox family of ROS-generating NADPH oxidase: physiology and pathophysiology. *Physiological Reviews*. V. 87, n. 01, p. 245 - 313. 2007.
- BEGRICHE, K. et al. Mitochondrial dysfunction in NASH: causes, consequences and possible means to prevent it. *Mitochondrion*. V. 6, p. 1-28. 2006.
- BERGHEIM, I. et al. Metformin prevents alcohol-Induced liver injury in the mouse: critical role of plasminogen activator inhibitor-1. *Gastroenterology*. V. 130(7), p. 2099-2112. 2006.
- BELLENTANI, S. et al. Drinking habits as cofactors of risks for alcohol induced liver damage. The Dionysos study group. *Gut*. V. 41, p. 845-850. 1997.
- BESANCON, F. Time to alcohol dependence after abstinence and first drink. *Addiction*. V. 88, p. 1647-1650. 1993.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. V. 72, p. 248-254. 1976.
- BRUNT, E. et al. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *The American Journal of Gastroenterology*. V. 94, p. 2467-2474. 1999.
- BRUNT, E. et al. Concurrence of histological features of steatohepatitis with other forms of chronic liver disease. *Modern Pathology*. V. 16, n.01, p. 49-56. 2003.
- BURT, A. et al. Diagnosis and interpretation of steatosis and steatohepatitis. *Seminars in Diagnostic Pathology*. V. 15, p. 246-258. 1998.
- CARLEZON, W; NESTLER, E. Elevated levels of GluR1 in the midbrain: a trigger for sensitization to drugs of abuse? *Trends in Neurosciences*. V. 25, p. 610-615. 2002.
- CARLINI, E. et al. II Levantamento domiciliar sobre o uso de drogas psicotrópicas no Brasil: estudo envolvendo as 108 maiores cidades do país. *Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas (CEBRID) e Secretaria Nacional Antidrogas (SENAD)*. 2005.
- CARLSSON, S; HAMMAR, N.; GRILL, V. Alcohol consumption and type II diabetes: meta-analysis of epidemiological studies indicates a U-shaped relationship. *Diabetologia*. V. 48, p. 105–1054. 2005.
- CASTOR, L. LOCATELLI, K.; XIMENES, V. Pro-oxidant activity of apocynin radical. *Free radical Biology & Medicine*. V. 48, p. 1636-1643, 2010.

- CASTRO, L.; BALTIERI, D. Tratamento farmacológico da dependência do álcool. *Revista Brasileira de Psiquiatria*. V. 26, p. 43-46. 2004.
- CERAVOLO, G. et al. Angiotensin II chronic infusion induces B1 receptor expression in aorta of rats. *Hypertension*. V. 50, p. 756-761. 2007.
- CHAKRABORTI, S. et al. Protective role of magnesium in cardiovascular diseases: a review. *Molecular Cell Biochemistry*. V. 238, p. 163-179. 2002.
- CIFUENTES, M.; PAGANO, P. Targeting reactive oxygen species in hypertension. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*. V. 15, n. 02, p. 179 - 186. 2006.
- CNOP, M. et al. The current accumulation of intra-abdominal and subcutaneous fat explains the association between insulin resistance plasma leptin concentrations: distinct metabolic effects of two fat compartments. *Diabetes*. V. 51, p. 1005-1015. 2003.
- COATES, P. Liver function tests. *Australian Family Physician*. V. 40, n.03, p. 113-115. 2011.
- COVEY, M. et al. Effect of the mitochondrial antioxidant, Mito Vitamin E, on hypoxic-ischemic striatal injury in neonatal rats: a dose-response and stereological study. *Experimental Neurology*. V. 199, p. 513-519. 2006.
- CRABB, D. Pathogenesis of alcoholic liver disease: newer mechanism of injury. *The Keio Journal of Medicine*. V. 48, p. 184-188. 1999.
- CROFT, K. et al. Oxidative susceptibility of low-density lipoproteins – influence of regular alcohol use. *Alcoholism: clinical and experimental research*. V. 20, p. 980-984. 1996.
- CURRY-MCCOY, T. et al. Chronic ethanol consumption results in atypical in liver injury in copper/zinc superoxide dismutase deficient mice. *Alcoholism: clinical and experimental research*. V.34, n.02, p. 251-261. 2010.
- DAY, B. Catalytic antioxidants: a radical approach to new therapeutics. *Therapeutics focus*. V. 9, n. 13, p. 557-566. 2004.
- DAY, C. Genes or environment to determine alcoholic liver disease and non-alcoholic fatty liver disease. *Liver international*. V. 26, p. 1021-1028. 2006.
- DAY, C.; JAMES, O. Steatohepatitis: a tale of two “hits”? *Gastroenterology*. V. 114, p. 842-845. 1998.
- DE FEO, P. et al. Ethanol impairs post-prandial protein metabolism. *The Journal of Clinical Investigation*. V. 95, p. 1472-1479. 1995.
- DE LORGERIL, M.; Salen, P. Wine ethanol, platelets and Mediterranean diet. *The Lancet*. V. 353, p. 1067. 1999.
- DE MINICIS, S.; BRENNER, D. Oxidative stress in alcoholic liver disease: role of NADPH oxidase complex. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. V. 23, p. S98-S103. 2008.



DI CASTELNUOVO, A. et al. Alcohol dosing and total mortality in men and women: an updated meta-analysis of 34 prospective studies. *Archives of Internal Medicine*. V. 166, p. 2434 – 2445. 2006.

DODD-O, J. et al. Effect of NADPH inhibition on cardiopulmonary bypass-induced lung injury. *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology*. V. 287, p. H927-H936. 2004.

DRAGANOV, D. et al. Human paraoxonases (PON1, PON2, and PON3) are lactonases with overlapping and distinct substrate specificities. *Journal of Lipid Research*. V. 46, p. 1239-1247. 2005.

DRINKING AND YOU. Portal for advice about sensible Alcohol Consumption, National Government Guidelines and your health for the United Kingdom, The United States of America, Canada, France, Espana and Deutschland. Disponível em <http://www.drinkingandyou.com>. Acesso em 28 de outubro de 2011.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews*. V. 82, p. 7-95, 2002.

DRUCKER, D. The role of gut hormones in glucose homeostasis. *The Journal of Clinical Investigation*, V. 117, p. 24-32. 2007.

DUNN, W; XU, R.; SCHWIMMER, J. Modest wine drinking and decreased prevalence of suspected nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. V. 47, p.1947-1954. 2008.

DUSTING, G; SELEMIDIS, S.; JIANG, F. Mechanisms for suppressing NADPH oxidase in the vascular wall. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. V. 100, p. 97-103. 2005.

ELCHURI, S. et al. CuZnSOD deficiency leads to persistent and widespread oxidative damage and hepatocarcinogenesis later in life. *Oncogene*. V. 24, p.367-380. 2005.

ELLMARK, S. et al. The contribution of Nox4 to NADPH oxidase activity in mouse vascular smooth muscle. *Cardiovascular Research*. V. 65, n. 2, p. 495 - 504. 2005.

/

EMESON, E. et al. Chronic alcohol feeding inhibits atherogenesis in C57BL/6 hyperlipidemic mice. *American journal of Pathology*. V. 147, n. 06, p. 1749-1758. 1995.

ENGELS, F. et al. Effects of apocynin, a drug isolated from the roots of *Picrorhiza kurroa*, on arachidonic acid metabolism. *FEBS letter*. V. 305, p. 254 - 256. 1992.

ESTRUCH, R; Coca, A; Rodicio, J. High blood pressure, alcohol and cardiovascular risk. *Journal of Hypertension*. V. 23, p.226-229. 2005.

EZZATI, M. et al. Comparative quantification of health risks: global and regional burden of disease attributable to selected major risk factors. In: LOPES A. et al (Org.). Global burden of disease and risk factors. Washington (DC): World Bank, 2006, cap. 04, p. 241-268.

FARESE, R.; SMITH, S. Triglyceride synthesis: insights from the cloning of diacylglycerol acyltransferase. *Current Opinion in Lipidology*. V. 11, p. 229-234. 2000.

FELDSTEIN, A. et al. Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF- $\alpha$  expression via a lysosomal pathway. *Hepatology*. V. 4, p. 185-194. 2004.

FELDSTEIN, A. et al. Bax inhibition protects against free fatty acid-induced lysosomal permeabilization. *American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology*. V. 290, p. 1339-1346. 2006.

FERRÉ, N. et al. Paraoxonase-1 is associated with oxidative stress, fibrosis and FAS expression in chronic liver diseases. *Journal of Hepatology*. V. 45, p. 51-59. 2006.

FOLCH, J; LEES, M.; SLOANE STANLEY, G. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*. V. 226, p. 497-509, 1957.

FRAYN, K. Visceral fat and insulin resistance - causative or correlative? *British Journal of Nutrition*. V. 83, S1, p. S71-S77. 2000.

FRIEDEWALT, W. LEVI, R.; FREDRICKSON, D. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clinical Chemistry*. V. 18, p. 499-502. 1972.

FROMENTY, B. et al. Chronic ethanol consumption lessens the gain of body weight, liver triglycerides and diabetes in obese ob/ob. *Pharmacology & Experimental Therapeutics*. V. 331, n. 01, p. 23-34. 2009.

FUEKI, Y et al. Regular alcohol consumption improves the insulin resistance in health Japanese men independent of obesity. *Clinica Chimica Acta*. V. 382, p. 71 - 76. 2007.

FUJIMIYA, T. et al. Michaelis-Menten elimination kinetics of acetaldehyde during ethanol oxidation. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. V. 26, p. 49S-54S. 2002.

GAO, B; JEONG, W.; TIAN, Z. Liver: an organ predominant innate immunity. *Hepatology*. V. 47, p. 729-736. 2008.

GIGLEUX, I. et al. Moderate alcohol consumption is more cardioprotective in men with the metabolic syndrome. *Journal of Nutrition*. V. 136, p. 3027-3032. 2006.

GOMES, C; SOUZA, V.; RABÊLO, L. Assessment of glucose regulation, triglycerides and lipid peroxidation profiles in the serum mice induced chronic ethanol. In: Inter-American Society Hypertension (IASH/SBH), 18. 2009. Belo Horizonte, Brazil. Abstracts. Belo Horizonte: IASH/SBH. 2009, p.07.

GONZALES, R; JOB, M.; DOYON, W. The role of mesolimbic dopamine in the development and maintenance of ethanol reinforcement. *Pharmacology & Therapeutics*. V. 103, p. 121-146. 2004.

GRIENGLING, K; SORESCU, D.; USHIO-FUKAI, M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circulation Research*. V. 38, p. 494-501. 2000.

GRØNBAEK, M. et al. Changes in alcohol intake and mortality: a longitudinal population study. *Epidemiology*. V. 15, p. 222-228. 2004.

GUNJI, T. et al. Light and moderate alcohol consumption significantly reduces the prevalence of fatty liver in the Japanese male population. *The American Journal of Gastroenterology*. V. 104, p. 2189 - 2195. 2009.

GUNZERATH, L. et al. National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism report on moderate drinking. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. V. 28, n. 6, p. 829-847. 2004.

GUZIK, T.; HARRISON, D. Vascular NADPH oxidases as drug targets for novel antioxidant strategies. *Drug Discovery Today*. V. 11, n. 11/12, p. 524-533. 2006.

HALL, P. et al. Models of alcoholic liver disease in rodents: a critical evaluation. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. V. 25, p. 254S-261S. 2001.

HAMILTON, C. et al. NAD(P)H oxidase inhibition improves endothelial function in rat and human blood vessels. *Hypertension*. V. 40, p. 755 - 762. 2002.

HANADA, S. et al. The genetic background modulates susceptibility to mouse liver Mallory-denk body formation and liver injury. *Hepatology*. V. 48, n. 03, p. 943-952. 2008.

HART, B. et al. Antiarthritic activity of the newly developed neutrophil oxidative burst antagonist apocynin. *Free Radical Biology & Medicine*. V. 09, n. 02, p. 127 -131. 1990.

HEBERDEN, W. Some accounts of disorders of breast. *Medical transactions of Royal College of Physicians*. V. 2, p. 59. 1786.

HERNANDEZ, R. et al. Rosiglitazone ameliorates insulin resistance in brown adipocytes of wistar rats by impairing TNF-alpha induction of p38 and p42/p44 mitogen-activated protein kinases. *Diabetologia*. V. 47, p. 1615-1624. 2004.

HEUMÜLLER, S. et al. Apocynin is not an inhibitor of vascular NADPH oxidases but an antioxidant. *Hypertension*. V. 51, p. 211-217. 2008.

HOLLAND, J. et al. Thrombin stimulated reactive oxygen species production in cultured human endothelial cells. *Endothelium*. V. 06, n. 01, p. 113-121. 1997.

HONG, F. et al. Interleukin 6 alleviates hepatic steatosis and ischemia/reperfusion injury in mice with fatty liver. *Hepatology*. V. 40, p. 933-941, 2004.

HONG, J. et al. Alcohol consumption promotes insulin sensitivity without affecting body weight. *International Journal of Obesity*. V. 33, p. 197 – 203. 2009.

HOUGEE, S. et al. Oral administration of the NADPH-oxidase inhibitor apocynin partially restores diminished cartilage proteoglycan synthesis and reduces inflammation in mice. *European journal of pharmacology*. V. 531, n.1-3, p. 264-269. 2006.

HOWARD, A; ARNSTEN, J.; GOUREVITCH, M. Effects of alcohol consumption on diabetes mellitus: a systematic review. *Annals of Internal Medicine*. V. 140, p. 211-219. 2004.

HUSAIN, K. Vascular endothelial oxidative stress in alcohol-induced hypertension. *Cell and Molecular Biology*. V. 53, p. 70 -77. 2007.

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

HUSAIN, K.; SOMANI, S. Interaction of exercise and ethanol on hepatic and plasma antioxidant system in rat. *Pathophysiology*. V. 4, p. 69-74. 1997.

IMHOF, A. et al. Overall alcohol intake, beer, wine, and systemic markers of inflammation in Western Europe: results from three MONICA samples (Augsburg, Glasgow, Lille). *European Heart Journal*. V. 25, p. 2092-2100. 2004.

IMHOF, A. et al. Effects of drinking on adiponectin in health men and women: a randomized intervention study of water, ethanol, red wine, and beer with and without alcohol. *Diabetes Care*. V. 32, p. 1101-1103. 2009.

IREDALE, J. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. *The Journal Clinical Investigation*. V. 117, n. 03, p. 539 - 548. 2007.

IWATA, M. et al. Pioglitazone ameliorates tumor necrosis factor-alpha-induced insulin resistance by a mechanism independent of adipogenic activity of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Diabetes*. V. 50, p. 1083-1092. 2001.

JACOBSON, G. et al. Novel NAD(P)H oxidase inhibitor suppresses angioplasty-induced superoxide and neointimal hyperplasia of rat carotid artery. *Circulation Research*. V. 92, p. 637 - 643. 2003.

JENSEN, T. et al. A daily glass red wine induces a prolonged reduction in plasma viscosity: a randomized controlled trial. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*. V. 17, p.471-476. 2006.

JOHNSON, P.; KENNY, P. Dopamine D2 receptors in addiction-like reward dysfunction and compulsive eating in obese rats. *Nature Neuroscience*. V. 13, p. 635-641. 2010.

JORDÃO JR., A. et al. Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutatona reduzida e da vitamina E. *Medicina, Ribeirão Preto*. V. 31, p. 434-449. 1998.

KABIR, M. et al. Molecular evidence supporting the portal theory: a causative link between visceral adiposity and hepatic insulin resistance. *The American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*. V. 288, p. E454-E461. 2005.

KANEGAE, M. et al. Diapocynin versus apocynin as pretranscriptional inhibitors of NADPH oxidase and cytokine production by peripheral blood mononuclear cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. V. 393, p. 551 – 554. 2010.

KANG, L. et al. Chronic ethanol and triglyceride turnover in White adipose tissue in rats. *The journal of biological chemistry*. V. 282, n.39, p. 28465-28473. 2007. [a]

KANG, L. et al. Chronic ethanol-induced insulin resistance is associated with macrophage infiltration into adipose tissue and altered expression of adipocytokines. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. V. 31, p. 1581-1588. 2007. [b]

KERR, W. et al. A drink is a drink? Variation in the amount of alcohol contained in beer, wine, and spirits drinks in a US methodological sample. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. V. 25, p. 2015-2021. 2005.

KESSOVA, I. et al. Alcohol induced liver injury in mice lacking Cu, Zn-Superoxide dismutase. *Hepatology*. V. 38, p. 1136-1145. 2003.

KETONEN, J. et al. Periadventitial adipose tissue promotes endothelial dysfunction via oxidative stress in diet-induced obese C57Bl/6. *Circulation Journal*. V. 74, n. 07, p. 1479 - 1487. 2010.

KIESSLING, K.; PILSTRÖM, L. Effect of ethanol on rat liver. I. Enzymatic and histological studies of liver mitochondria. *Quartely Journal of Studies on Alcohol*. V. 27, n.2, p. 189-200. 1966.

Killic, S. et al. Serum arylesterase and paraoxonase activity in patients with chronic hepatitis. *World Journal of Gastroenterology*. V. 11, p.7351-7354. 2005.

KIM, J. et al. Apocynin in treatment of Ischemic stroke. *The Open Drug Discovery Journal*. V. 2, p. 187-192. 2010.

KIM, S. et al. Anti-inflammatory effects of apocynin, an inhibitor of NADPH oxidase, in airway inflammation. *Immunology and Cell Biology*. V. X, p. X. 2011.

KIM, J; TANG, X.; YENARI, M. Apocynin in the treatment of ischemic stroke. *The open drug discovery Journal*. V. 2, p.187-192. 2010.

KLATSKY, A. Blood pressure and alcohol intake. In *Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis, and Management: second edition*, Laragh, J.H. and Brenner, B.M., eds. p. 2649-2667. Raven Press, New York. 1995.

KLEINER, D. et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. V. 41, p. 1313-1321. 2005.

KLESGES, R; MEALER, C.; KLESGES, L. Effects of alcohol intake on resting energy expenditure in young women social drinkers. *The American Journal of Clinical Nutrition*. V. 59, p.805-809. 1994.

KLONER, R.; RESKALLA, S. To drink or not to drink: That is the question. *Circulation*. V. 116, p. 1306–1317. 2007.

KOPPEL, L. et al. Moderate alcohol consumption lowers the risk of type 2 diabetes: a meta-analysis of prospective observational studies. *Diabetes Care*. V. 28, p.719-725. 2005.

KAWASE, T; KATO, S.; LIEBER, C. Lipid peroxidation and antioxidant defense systems in rat liver after chronic ethanol feeding. *Hepatology*. V. 10, p. 815-821. 1989.

KRYSTAL, J. et al. N-methyl-D-aspartate glutamate receptors and alcoholism: reward, dependence, treatment, and vulnerability. *Pharmacology & Therapeutics*. V. 99, p. 79-94. 2003.

LACKNET, C. et al. Ballooned hepatocytes in steatohepatitis: the value of keratin immunohistochemistry for diagnosis. *Journal of Hepatology*. V. 48, p. 821-828. 2008.

LAFEBER, F. et al. Apocynin, a plant-derived, cartilage-saving drug, might be useful in the treatment of rheumatoid arthritis. *Rheumatology*. V. 38, p. 1088 -1093. 1999.

LARANJEIRA, R. et al. I Levantamento Nacional sobre os Padrões de Consumo de Álcool na População Brasileira. *Secretaria Nacional Antidrogas (SENAD); Unidade de Pesquisa em Álcool e Drogas (UNIAD/UNIFESP)*. 2007.

LAROSCHE, I. et al. Prolonged ethanol administration depletes mitochondrial DNA in MnSOD-overexpressing transgenic mice, but not in their wild type littermates. *Toxicology and Applied Pharmacology*. V. 234, p. 326-338. 2009.

LEE, D; HA, M.; CHRISTIANI, D. Body weight, alcohol consumption and liver enzyme activity - a 4 year follow-up study. *International Journal of Epidemiology*. V. 30, p. 766-770. 2001.

LI, Y. et al. Effect of acute alcoholism on hepatic enzymes and oxidation/antioxidant in rats. *Hepatobiliary and Pancreatic Diseases International*. V. 3, p. 241-244. 2004.

LIAN, C. L'alcoholism cause d'hypertension arterielle. *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine*. V. 74, p. 525-528. 1913.

LIEBER, C. Ethanol metabolism, cirrhosis and alcoholism. *Clinica Chimica Acta*. V. 257: 59-84. 1997. [a]

LIEBER, C. Cytocrome P4502E1: its physiological and pathological role. *Physiological Review*. V. 77, p.517-544. 1997. [b]

LIEBER, C. Alcohol and Liver: metabolism of alcohol and its role in hepatic and extrahepatic diseases. *The Mount Sinai Journal of Medicine*. V. 67, p. 84-93. 2000.

LIEBER, C.; DECARLI, L. The feeding of alcohol in liquid diets: two decades of applications and 1982 update. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. V. 6, p. 523-531. 1982.

LIEBER, C; JONES, D.; DECARLI, L. Effects of prolonged alcohol intake: production of fatty liver despite adequate diets. *The Journal of Clinical Investigation*. V. 44, p. 1009-1021, 1965.

LIU, P. et al. Protective effects of apocynin and allopurinol on ischemia/reperfusion-induced liver injury in mice. *World Journal of Gastroenterology*. V. 14, n. 18, p. 2832 - 2837. 2008.

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

- LULL, M. et al. Chronic apocynin treatment attenuates beta amyloid plaque size and microglial number in hAPP(751)<sub>SL</sub> mice. *Plos one*. V. 531, p. 264 - 269. 2011.
- MACKNESS, M. et al. Serum paraoxonase activity in familial hypercholesterolemia and insulin dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis*. V. 86, p. 193-199. 1995.
- MAIORANO, G. et al. Noninvasive detection of vascular dysfunction in alcoholic patients. *American Journal of Hypertension*. V. 12, p. 137-144. 1999.
- MALHI, H; GUICCIARDI, M.; GORES, G. Hepatocyte death: a clear and present danger. *Physiological Review*. V. 90, p. 1165-1194. 2010.
- MANDREKAR, P.; SZABO, G. Signalling pathways in alcohol-induced liver inflammation. *Journal of Hepatology*. V. 50, p. 1258-1266. 2009.
- MANACH, C.; DONOVAN, J. Pharmacokinetics and metabolism of dietary flavonoids in humans. *Free radical Research*. V. 38, n. 8, p. 771-785. 2004.
- MANZO-AVALOS, S.; SAAVEDRA-MOLINA, A. Cellular and Mitochondrial effects of alcohol consumption. *International Journal Environmental Research and Public Health*. Vol. 7, p. 4281-4304. 2010.
- MARSILLSACH, J. et al. Serum paraoxonase-1 in chronic alcoholics: relationship with liver disease. *Clinical Biochemistry*. V. 40, p. 645-650. 2007.
- MARSILLACH, J. et al. Immunohistochemical analysis of paraoxonases 1, 2 and 3 expression in normal mouse tissue. *Free Radical Biology & Medicine*. V. 45, p. 46-57. 2008.
- MATTES, R. Fluid calories and energy balance: the good, the bad, and the uncertain. *Physiological Reviews*. V. 89, p. 66-70. 2006.
- MCBRIDE, W.; LI, T. Animals models of alcoholism: neurobiology of high alcohol-drinking behavior in rodents. *Critical Reviews in Neurobiology*. V. 12, p. 339-369. 1998.
- MEAGER, E. et al. Alcohol-induced generation of lipid peroxidation products in humans. *The Journal of Clinical Investigation*. V. 104, p. 805-813. 1999.
- MEILIN, E; Aviram, M.; Hayek, T. Paraoxonase 2 (PON2) decreased high glucose-induced macrophage triglycerides (TG) accumulation, via inhibition of NADPH-oxidase and DGAT1 activity: Studies in PON2-deficient mice. *Atherosclerosis*. V. 208, p. 390-395. 2010.
- MOLLNAU, H. et al. Effects of angiotensina II infusion on the expression and function of NAD(P)H oxidase and components of nitric oxide/cGMP signaling. *Circulation Research*. V. 90, p. E50-E65. 2002.
- MULLER, F. et al. Absence of CuZn superoxide dismutase leads to elevated oxidative stress and acceleration of age-dependent skeletal muscle atrophy. *Free radical Biology & Medicine*. V. 40, p. 1993-2004. 2006.

MUIJSERS, R. et al. Apocynin inhibits peroxy-nitrite formation by murine macrophages. *British Journal Pharmacology*. V. 130, p. 932 - 936. 2000.

MURGATROYD, P. et al. Alcohol and the regulation on energy balance: overnight effects on diet-induced thermogenesis and fuels storage. *British Journal of Nutrition*. V. 75, p. 33-45. 1996.

NANJI, A. Role of different dietary fatty acids in the pathogenesis of experimental alcoholic fatty liver disease. *Alcohol*. Vol. 34, p. 21-25. 2004.

NANJI, A.; FRENCH, S. Animal models of alcoholic liver disease –Focus on the intragastric feeding model. *Research update*. V. 27, n.04, p. 325 – 330. 2003.

NEATON et al. Impact of systolic and diastolic blood pressure on cardiovascular mortality. *In Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and management*, Laragh, J.H. and Brenner, B.M. eds., p. 127-145. Raven press Publishers, New York, NY.

NORDMANN, R; RIBIÈRE, C.; ROUACH, H. Implication of free radical mechanisms in ethanol-induced cellular injury. *Free radical Biology & Medicine*. Vol. 12, p. 219-240. 1992.

NOVELLI, E. 2005. Nutrição e Vida Saudável. Estresse oxidativo e metabolismo energético. Ed. Tecmedd. São Paulo. 288 p.

NYBLOM, H et al. High AST/ALT may indicate advanced alcoholic liver disease rather than heavy drinking. *Alcohol & Alcoholism*. V. 39, p. 336-339. 2004.

O'DONNELL, B. et al. Studies on the inhibitory mechanism of iodonium compounds with special reference to neutrophil NADPH oxidase. *Biochemistry Journal*. V. 290, p. 41 - 49. 1993.

O'SHEA, R; DASARATHY, S.; MCCOLLOUGH, A. Alcoholic liver disease. *The American Journal of Gastroenterology*. V.105, p.14-32. 2010.

OZARAS, R. et al. N-acetylcysteine attenuates alcohol-induced oxidative stress in the rat. *World Journal of Gastroenterology*. V. 9, 125-128. 2003.

PAI, J. et al. Moderate alcohol consumption and lower levels of inflammatory markers in US men and women. *Atherosclerosis*. V. 186, p. 113-120. 2006.

PECHÁNOVÁ, O. et al. Beneficial effects of Provinols: cardiovascular system and kidney. *Physiological Research*. V. 55 (S1), p. 17-30. 2006.

PECHÁNOVÁ, O.; SIMKO, F. Chronic antioxidant therapy fails to ameliorate hypertension: potential mechanisms behind. *Journal of Hypertension*. V. 27, S32-S36. 2009.

PIANO, M. et al. The effects of a liquid ethanol diet on nutritional status and fluid balance in the rat. *Alcohol & Alcoholism*. V. 36, p. 298-303. 2001.

Plavnik, F. Hipertensão arterial induzida por drogas: como detectar e tratar. *Revista Brasileira de Hipertensão*. V. 9, p. 185-191. 2002.



- RABÊLO, L. et al. Desbalanço Redox: NADPH oxidase como alvo terapêutico no manejo cardiovascular. *Arquivos Brasileiros Cardiologia*. V. 94(5), p. 684-693. 2010.
- RANDIN, D. et al. Suppression of alcohol-induced hypertension by dexamethasone. *New England Journal of Medicine*. V. 332, p. 1733-1737. 1995.
- RAO, M. et al. Light, but not heavy alcohol drinking, stimulates paraoxonase by upregulating liver mRNA in rats and humans. *Metabolism*. V. 52, p. 1287-1294. 2003.
- REHM, J. et al. Global burden of disease and injury and economic cost attributable to alcohol use and alcohol-use disorders. *The Lancet*. V. 373, p. 2223-2233. 2009.
- RENAUD, S. et al. Alcohol and mortality in middle-aged men from eastern France. *Epidemiology*. V. 09, p. 184-188. 1998.
- RENAUD, S. et al. Alcohol and Mortality from all causes. *Biology Research*. V. 37, p. 183-187. 2004.
- RENAUD, S.; LORGERIL, M. Wine, alcohol, platelet aggregation and the French paradox for coronary heart disease. *The Lancet*. V. 339, p. 1523-1526. 1992.
- RIGANTI, C. et al. The NADPH oxidase inhibitor apocynin (acetovallone) induces oxidative stress. *Toxicology and Applied Pharmacology*. V. 212, p. 179-187. 2006.
- RIMM, E. et al. Moderate alcohol intake and lower risk of coronary heart disease: meta-analysis of effects on lipids and haemostatic factors. *British Medical Journal*. V. 319, p. 1523-1528. 1999.
- RICHTER, C.; CAMPBELL, K. Alcohol taste thresholds and concentrations of solution preferred by rats. *Science*. V. 914, p. 507-508. 1940.
- ROBIN, M. et al. Alcohol increases tumor necrosis factor  $\alpha$  and decreases nuclear factor-kB to active hepatic apoptosis in genetically obese mice. *Hepatology*. V. 42, p. 1280-1290. 2005.
- ROCHA, K. et al. Weekend ethanol consumption and high-sucrose diet: resveratrol effects on energy expenditure, substrate oxidation, lipid profile, oxidative stress and hepatic energy metabolism. *Alcohol & Alcoholism*. V. 46, n.1, p 10-16. 2010.
- ROUACH, H. et al. Effects of chronic ethanol feeding on lipid peroxidation and protein oxidation in relation to liver pathology. *Hepatology*. V. 25, p. 351-355. 1997.
- RUIZ, J. et al. Gln-Arg 191 polymorphism of paraoxonase and coronary heart disease in type 2 diabetes. *The Lancet*. V. 346, p. 869-872. 1995.
- SALVEMINI, D; ISCHIROPOULOS, H.; CUZZOCREA, S. Roles of nitric oxide and superoxide in inflammation. *Methods in Molecular Biology*. V. 225, p. 291-303. 2003.
- SANTORO, S. Hipertrofia intestinal induzida por alimento e obesidade. *Einsein*. V. 3, n. 4, p. 310-312. 2005. [a].

SANTORO, S. Anthropological aspects of obesity. In: 10<sup>th</sup> World Congress of the International Federation for Surgery of Obesity (IFSO), 2005. Maastricht, Netherlands. [b].

SANYAL, A. et al. A pilot study of vitamin E versus vitamin E and Pioglitazone for the treatment of nonalcoholic steatohepatitis. *Clinical Gastroenterology & Hepatology*. V. 2, p. 1107-1115. 2004.

Sbarra, A; Karnovsky, M. The biochemical basis of phagocytosis. I. Metabolic changes during the ingestion of particles by polymorphonuclear leukocytes. *Journal of the biological chemistry*. V. 234, p. 1355-1362.1959.

SCHLORFF, E; Husain, S.; Somani, S. Dose- and time-dependent effects of ethanol on plasma antioxidant system in rat. *Alcohol*. V.17, n. 02 p.97-105. 1999.

SCHLÜTER, T. et al. Apocynin-induced vasodilation involves Rho kinase inhibition but not NADPH oxidase inhibition. *Cardiovascular Research*. V. 80, p. 271 - 279. 2008.

SEBASTIAN, B.; NAGY, L. Decreased insulin-dependent glucose transport by chronic ethanol feeding is associated with dysregulation of the Cbl/TC10 pathway in rat adipocytes. *The American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*. V. 289, p. E1077-E1084. 2005.

SEIVA, F. et al. Effects of N-acetylcysteine on alcohol abstinence and alcohol-induced adverse effects in rats. *Alcohol*. V. 43, p. 127-135. 2009.

SHI, J. et al. PR-39, a proline-rich antibacterial peptide that inhibits phagocyte NADPH oxidase activity by binding to Src homology 3 domains of p47 phox. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*. V. 93, p. 6014 - 6018. 1996.

SHIN, A. et al. Chronic exposure to a high fat diet affects stress axis function differentially in diet-induced obese and diet-resistant rats. *International Journal of Obesity*. V. 34, n. 7, p. 1218 – 1226. 2010.

SIMIÉ, A. et al. Electrochemical behavior and antioxidant and prooxidant activity of natural phenolics. *Molecules*. V. 12, p. 2327- 2340. 2007.

SIMONS, J. et al. Metabolic activation of natural phenols into selective oxidative burst agonists by activated human neutrophils. *Free Radical Biology & Medicine*. V. 08, p. 251 - 258. 1990.

SMITH-KIELLAND, A. et al. Effects of chronic ethanol consumption on in vivo protein synthesis in livers from female and male rats fed two different diet regimens. *Alcohol & Alcoholism*. V. 18, p. 285-292. 1983.

SOMANI, S. et al. Interaction of exercise and ethanol on antioxidant enzymes in brain regions of the rat. *Alcohol*. V. 13, p.603 - 610. 1996.

SONKO, B. et al. Effects of alcohol on postmeal fat storage. *The American Journal of Clinical Nutrition*. V. 59, p. 619 - 625. 1994.

SOZIO, M.; CRABB, D. Alcohol and lipid metabolism. *American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism*. V. 295, p.E10 - E16. 2008.

SPANAGEL, R. Recent animal models of alcoholism. *Alcohol Research & Health*. V. 24, n. 02, p. 124-131. 2000.

STEFANSKA, J.; PAWLICZAK, R. Apocynin: molecular aptitudes. *Mediators of Inflammation*. V. 2008, p. 1-10. 2008.

STEFFEN, Y, et al. Mono-O-methylated flavanols and other flavonoids as inhibitors of endothelial NADPH oxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. V. 469, p.209-219. 2008.

STEVENS, C.; HUME, I. 1995. Comparative physiology of the vertebrate digestive system. *Cambridge University Press*, 239 p.

SUZUKI, K. et al. Moderate alcohol consumption is associated with better endothelial function: a cross sectional study. *BioMed Central Cardiovascular disorders*. V. 9 p.1-5. 2009.

SUN, H. et al. Role of NAD(P)H oxidase in alcohol-induced impairment of endothelial nitric oxide synthase-dependent dilation of cerebral arterioles. *Stroke*. V. 37, p. 495-500. 2006.

TANG, X. et al. Apocynin improve outcome in experimental stroke with a narrow dose range. *Neuroscience*. V. 154, p. 556-562. 2008.

TANNAPFEL, A. et al. Histopathological diagnosis of non-alcoholic and alcoholic fatty liver disease. *Virchows Archives*. V. 458(5), p. 511–523. 2011.

TAUBERT, D. et al. Chocolate and blood pressure in elderly individuals with isolated systolic hypertension. *The Journal of American Medical Association*. V. 290(8), p.1029-1030. 2004.

THALLAS-BONKE et al. Inhibition of NADPH oxidase prevents advanced glycation end product-mediated damage in diabetic nephropathy through a protein kinase C-alpha-dependent pathway. *Diabetes*. V. 57, n. 02, p. 460 - 469. 2008.

TINIAKOS, D. Liver biopsy in alcoholic and non-alcoholic steatohepatitis patients. *Gastroentérologie Clinique et biologique*. V. 33, p. 930 – 939. 2009.

TIRAPELLI, C. et al. Ethanol consumption enhances endothelin-1-induced contraction in the isolated rat carotid. *The journal of Pharmacology and Experimental therapeutics*. V. 318, n° 02, p. 819-827. 2006.

TITOVA, E. et al. Effects of apocynin and ethanol on intracerebral haemorrhage-induced brain injury in rat. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. V. 34, p. 845 - 850. 2007.

TOME, S.; LUCEY, M. Review article: current management of alcoholic liver disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. V. 19, p. 707-714. 2004.

TOMSON, J.; LIP, G. Alcohol and hypertension: an old relationship revisited. *Alcohol & Alcoholism*. V. 41, n. 01, p. 3-4. 2006.

TSUKAMOTO, H. et al. Experimental liver cirrhosis induced by alcohol and iron. *The Journal of Clinical Investigation*. Vol. 96, p. 620-630. 1996.

TURNER, R. et al. Is resveratrol an estrogen agonist in growing rats? *Endocrinology*. Vol. 140, p. 50-54. 1999.

UENO, S. et al. Alcohol actions on GABA (A) receptors: from protein structure to mouse behavior. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. V. 25, p. 76s-81s. 2001.

VAN DEN WORM, C. et al. Apocynin: a lead-compound for new respiratory burst inhibitors? In: Cruijff J, editor. *Vaak wordt een uitslag verward met de situatie*. p. 48-58. 1996.

VASCONCELOS, S. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Química Nova*. V. 30, p.1323-1338. 2007.

VEESTRA, J. et al. Effects of a moderate dose of alcohol on blood lipids and lipoproteins postprandially and in the fasting state. *Alcohol & Alcoholism*. V. 25, p. 371-377. 1990.

VEJRAŽKA, M; MIČEK, R.; ŠTÍPEK, S. Apocynin inhibits NADPH oxidase in phagocytes but stimulates ROS production in non-phagocytic cells. *Biochimica et Biophysica acta*. V. 1722, p. 143-147. 2005.

VERDAM, F. et al. Small intestine alterations in severely obese hyperglycemic subjects. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. V. 96, n.2, p. E379-E383. 2011.

VIEL, E. et al. Xanthine oxidase and mitochondria contribute to vascular superoxide anion generation in DOCA-salt hypertensive rats. *American Journal of Physiology: Heart and Circulation Physiology*. V. 295, p. H281-H288. 2008.

WAKABAYASHI, I. Association between alcohol drinking and metabolic syndrome in Japanese male works with diabetes mellitus. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*. V. 18, p. 01-08. 2011.

WAKI, K. et al. Alcohol consumption and other risk factors for self-reported diabetes among middle-aged Japanese: a population-based prospective study in the JPHC study cohort I. *Diabetic medicine*. V. 22, p. 323 -331. 2005.

WALLIN, B. et al. Lipoprotein oxidation and measurements thiobarbituric acid reacting substances formation in single microtiter plate: its use for evaluation of antioxidants. *Analytical Biochemistry*. V. 208, p. 10-15. 1993.

WALLIN, B.; MORLAND, J. The role of glucose and insulin in the effect of ethanol on protein synthesis in isolated rat hepatocytes. *Alcohol & Alcoholism*. Vol. 22, p. 219-226. 1987.

WALLNER, M.; OLSEN, R. Physiology and pharmacology of alcohol: the imidazobenzodiazepine alcohol antagonist site on subtypes on GABA<sub>A</sub> receptors as an

opportunity for drug development? *British Journal of Pharmacology*. V. 154, p. 288-298. 2008.

WANG, H; ZAKHARI, S; JUNG, M. Alcohol, inflammation, and gut-liver-brain interactions in tissue damage and disease development. *World Journal of Gastroenterology*. V. 16, n. 11, p. 1304-1313. 2010.

WANG, Y. et al. The human fatty acid synthase gene and de novo lipogenesis are coordinately regulated in human adipose tissue. *The Journal of Nutrition*. V. 134, p. 1032-1038. 2004.

WANNAMETHEE, S.; SHAPER, G. Alcohol, body weight, and weight gain in middle-aged men. *The American Journal of Clinical Nutrition*. V. 77, p. 1312 - 1317. 2003.

WILCOX, C. Effects of tempol and redox-cycling nitroxides in models of oxidative stress. *Pharmacology & Therapeutics*. V. 126, p. 119-145. 2010.

WIND, S. et al. Comparative pharmacology of chemically distinct NADPH oxidase inhibitors. *British Journal Pharmacology*. V. 161, p. 885 - 898. 2010.

WIŚNIEWSKA-KMYPL, J.; WROŃSKA-NOFER, T. Biological markers of oxidative stress induced by ethanol and iron overload in rats. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*. V. 07, p. 355 - 363. 1994.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). International classification of diseases and related health problems, 10<sup>th</sup> revision. Geneva. *World Health Organization*. 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). The global status report on alcohol and health. 3<sup>th</sup> edition. Geneva. *World Health Organization*. 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). WHO Expert Committee on problems related to alcohol consumption. Second report. Geneva: *World Health organization*. 2006.

YAMAGUCHI, T. et al. Late preconditioning by ethanol is initiated via an oxidant-dependent signaling pathway. *Free Radical Biology & Medicine*. V. 34, n. 03, p. 365 - 376. 2003.

YIN, H. et al. Differential gene expression and lipid metabolism in fatty liver induced by acute ethanol treatment in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*. V. 223, p. 225-233. 2007.

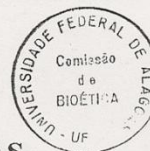
YIP, W.; BURT, A. Alcoholic liver disease. *Seminars in Diagnostic Pathology*. V. 23, p. 149-160. 2006.

ZALBA, G. et al. Oxidative stress in arterial hypertension: role of NAD(P)H. *Hypertension*. V. 38, p. 1395-1399. 2001.

ZHANG, Y. et al. Apocynin but not allopurinol prevents and reverses adrenocorticotrophic hormone-induced hypertension in the rat. *American Journal of Hypertension*. V. 18, n. 07, p. 910 - 916. 2005.

ZIMATKIN, S.; BUBEN, A. Ethanol oxidation in the living brain. *Alcohol & Alcoholism*. V. 42, n. 06, p. 529-532. 2007.

## ANEXO



### UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Maceió – AL, 12/11/2009

Senhor (a) Pesquisador (a), Luiza Antas Rabêlo  
Cheila Juliana César Gomes

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), em 12/11/2009 e com base no parecer emitido pelo (a) relator (a) do processo n° **009431/2009-29** sob o título, **desenvolvimento e caracterização de um modelo murino para o etilismo: avaliação das propriedades cardiovasculares e metabólicas** vem por meio deste instrumento comunicar a aprovação do processo supra citado, com base no item VIII.13, b, da Resolução n° 196/96.

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS 196/96, item V.4).

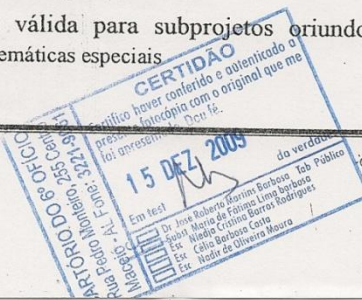
É papel do(a) pesquisador(a) assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e sua justificativa. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o(a) pesquisador(a) ou patrocinador(a) deve enviá-los à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem incluídas ao protocolo inicial (Res. 251/97, item IV. 2.e).

Relatórios parciais e finais devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos no Cronograma do Protocolo e na Res. CNS, 196/96.

Na eventualidade de esclarecimentos adicionais, este Comitê coloca-se a disposição dos interessados para o acompanhamento da pesquisa em seus dilemas éticos e exigências contidas nas Resoluções supra - referidas.

Esta aprovação não é válida para subprojetos oriundos do protocolo de pesquisa acima referido. ( ) Áreas temáticas especiais



*Dr. Walter Matias Lima*  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa