



CLARISSA LOURENÇO DE CASTRO

**EFEITOS DO CONSUMO SUBCRÔNICO DE ETANOL E DO
CICLO ESTRAL SOBRE A SEPSE EM RATOS WISTAR FÊMEAS**

Niterói
2011

CLARISSA LOURENÇO DE CASTRO

**EFEITOS DO CONSUMO SUBCRÔNICO DE ETANOL E
DO CICLO ESTRAL SOBRE A SEPSE EM RATOS
WISTAR FÊMEAS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós
Graduação em Patologia da Universidade
Federal Fluminense como requisito parcial
para a obtenção do Grau de Mestre.
Área de concentração: Patologia Geral

Orientadora: Vilma Aparecida da Silva Fonseca
Co-Orientadores: Elisabeth Martins da Silva da Rocha
Hugo Caire de Castro Faria Neto

Niterói
2011

C355 Castro, Clarissa Lourenço de
Efeitos do consumo subcrônico de etanol
e do ciclo estral sobre a sepse em ratos
wistar fêmeas / Clarissa Lourenço de
Castro. - Niterói : [s.n.], 2011.

58 f.:il., 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Patologia
Geral) - Universidade Federal Fluminense,
2011.

1. Sepse. 2. Etanol. 3. Estrogênios-
Ratos wistar. 4. Citocinas. I. Título.

CDD 616.944

RESUMO

Este estudo avaliou a evolução da sepse após o consumo de etanol em ratas fêmeas em estro. Foram realizados três experimentos, nos quais os grupos Controle (C e CS) receberam água enquanto os grupos Etanol (E e ES) receberam solução de etanol a 10% v/v. Após as quatro semanas de consumo de líquido e ração *ad libitum*, os animais que se encontravam nas fases estro do ciclo estral sofreram indução de sepse pelo método de injeção de fezes frescas no peritônio. O experimento 1 analisou a sobrevivência dos animais após indução séptica e o parâmetro mortalidade foi verificado em relação a 48 horas. Os animais foram divididos em grupos Sepse (S n=20) e Etanol Sepse (ES n=20). O experimento 2 verificou a resposta imune quanto ao nível de citocinas (TNF- α , IL-6, MIF, IL-10, IL-13, TGF- β), de estrogênio e os parâmetros bioquímicos (creatinina, uréia, ALT, AST, proteínas totais, glicose e albumina). Os animais foram divididos em grupos Controle (C n=12), Etanol (E n=12), Sepse (S n=20) e Etanol Sepse (ES n=25). Para a obtenção de sangue para as dosagens, foi realizada punção cardíaca 8 horas após indução da sepse nos grupos S e ES e após injeção de salina nos grupos C e E. O experimento 3 verificou a formação de colônias do lavado peritoneal. Os animais foram divididos em grupos Controle (C n=1), Etanol (E n=1), Sepse (S n=4) e Etanol Sepse (ES n=4). No experimento 1, não houve alteração do peso corporal pelo etanol (Peso S: $201,4 \pm 23,8$; ES: $184,4 \pm 23,7$ g, $p > 0,05$, teste t de Student). O consumo diário de etanol foi em média $10,9 \pm 1,9$ g/kg. Após 48 horas da indução de sepse, 17 animais do grupo S (85%) e 14 animais do grupo ES (70%) haviam morrido (Log-Rank $p = 0,0008$). No experimento 2, foi observado aumento nos níveis de citocinas pró-inflamatórias em decorrência da sepse. Houve também aumento nos níveis de TNF- α ($p = 0,0198$, Mann Whitney) e diminuição de IL-6 ($p = 0,0438$) e MIF ($p = 0,0264$) em ES em relação a S. Os níveis de estrogênio diminuíram significativamente em ES em comparação ao grupo E ($p < 0,0001$) e a sepse causou uma diminuição deste hormônio também entre os animais que consumiram água. O consumo de etanol elevou estes níveis após a sepse, demonstrado através da diferença entre os grupos ES e S ($p = 0,0035$). Na análise bioquímica foi observado aumento de creatinina e diminuição de glicose no grupo ES em relação aos grupos Etanol e Sepse. No experimento 3, não houve formação de colônias nos animais que não sofreram sepse e o grupo ES apresentou menor valor de UFC em relação ao grupo S, embora este valor não tenha sido significativo. Os resultados sugerem que o consumo de etanol pode aumentar o tempo de sobrevivência após indução séptica, possivelmente através do aumento nos níveis de estrogênio e modulação de citocinas pró-inflamatórias.

Palavras-chave: etanol, sepse, citocinas, estrogênio

ABSTRACT

The present study evaluated the evolution of sepsis after ethanol intake, relating the results to rats estrous cycle. Three experiments were performed in which Control groups (C and S) received water while Ethanol groups (E and ES) received 10% ethanol solution. Four weeks after liquid and food *ad libitum* consumption, animals in estrus phase had septic induction by the method of fresh feces injected into the peritoneum. Experiment 1 examined animals survival after sepsis and the mortality parameter was observed over 48 hours. Animals were divided in Sepsis (S n=20) and Ethanol Sepsis (ES n=20) groups. Experiment 2 examined immune response with the cytokines levels (TNF- α , IL-6, MIF, IL-10, IL-13, TGF- β), estrogen and biochemical parameters (creatinin, urea, ALT, AST, total proteins, glucose and albumin). Animals were divided in Control (C n=12), Ethanol (E n=12), Sepsis (S n=20) and Ethanol Sepsis (ES n=25) groups. To collect blood for the measurements, cardiac puncture was performed 8 hours after septic induction in S and ES groups and after saline injection in C and E groups. Experiment 3 verified the colonies formation of the peritoneal cavity. Animals were divided into Control (C n=1), Ethanol (E n=1), Sepsis (S n=4) and Ethanol Sepsis (ES n=4) groups. In experiment 1 there was no change in body weight by ethanol (Weight CS: 201,4 \pm 23,8; ES: 184,4 \pm 23,7g, $p > 0,05$, t Student test). Ethanol daily consumption was on average 10,9 \pm 1,9 g/kg. Twenty-four hours after sepsis induction 13 animals in Septic group (65%) and 2 animals in Ethanol Septic group (13%) had already died (Mann Whitney $p = 0,0314$). In experiment 2, sepsis increased pro-inflammatory cytokines levels. There was also an increase in TNF- α ($p = 0,0198$, Mann Whitney) and a decrease in IL-6 ($p = 0,0438$) and MIF ($p = 0,0264$) levels in ES compared to S. Estrogen levels decreased significantly in ES compared to E group ($p < 0,0001$) and sepsis caused a decrease of this hormone also in animals that had water intake. Ethanol consumption increased these levels after sepsis, as demonstrated by the difference between ES and S groups ($p = 0,0035$). Biochemical analysis showed an increase in creatinin and a decrease in glucose levels in ES compared to Ethanol and Sepsis groups. In experiment 3, there was no colonies formed in animals that had no septic induction and ES group had lower UFC compared to S, although this was not statistically significant. The results suggest that ethanol intake can increase survival time after septic induction, possibly by the increase in estrogen levels and modulation of pro-inflammatory cytokines.

Keywords: ethanol, sepsis, cytokines, estrogen

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Professora Vilma Aparecida da Silva Fonseca, por ter me aceito como aluna e pela experiência de vida e ciência adquirida durante esse período.

À minha co-orientadora, Professora Elisabeth Martins da Silva da Rocha pela importante colaboração em todas as fases de execução deste trabalho.

Ao meu co-orientador, Dr Hugo Caire de Castro Faria Neto, pela constante disponibilidade no esclarecimento de dúvidas, ajuda nas etapas fundamentais dos experimentos e incentivo após os resultados.

Aos membros da banca, por terem aceitado tão prontamente meu convite.

À Aline Silva de Aguiar Nemer, sem a qual a execução deste trabalho não seria possível. Agradeço, principalmente, por todas as correções e sugestões para a conclusão da dissertação.

Ao técnico de Biotério, Redinei Laurindo, por estar sempre presente e alegre nas atividades no Biotério do Instituto Biomédico, mesmo nos finais de semana, madrugadas e feriados.

Ao técnico do Laboratório de Fisiologia e Farmacodinâmica da Fiocruz, Edson Assis, pela colaboração, competência e boa vontade nas dosagens durante os experimentos.

À Professora Elisabeth Maróstica, pela importante ajuda disponibilizando seu laboratório para o prosseguimento dos experimentos.

Ao Professor Porfírio José Soares Filho pela presteza, competência e gentileza no esclarecimento de dúvidas em relação à histologia.

Às equipes do CON e do INCA, pelo interesse sobre a conclusão do trabalho e pelas trocas de horários, nos momentos em que precisei me dedicar à dissertação.

Aos meus pais, pela presença em minha vida.

Ao meu namorado, Alexandre, pelo incentivo estudando e discutindo comigo, desde o início da graduação.

Por último, porém não menos importante, à minha amiga Flávia Rocha de Barros, minha "dupla dinâmica", pela honestidade e companheirismo, mesmo nos momentos mais difíceis e frustrantes durante esses anos. Parabéns e obrigada por tudo!

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.3.1 Experimento 1: esquema das quatro semanas de consumo de água (grupo S) e etanol a 10% v/v (grupo ES) seguidas da indução de sepse 24

Figura 4.4.1 Experimento 2: esquema das quatro semanas de consumo de água (grupos C e CS) e etanol a 10% v/v (grupos E e ES) seguidas da indução de sepse (CS e ES) e injeção de salina via i.p. (C e E) e coleta de sangue para dosagens..... 29

Figura 4.5.1 Experimento 3: esquema das quatro semanas de consumo de água (grupos C e CS) e etanol a 10% v/v (grupos E e ES) seguidas da indução de sepse (CS e ES) e injeção de salina via i.p. (C e E) e coleta de lavado peritoneal para quantificação bacteriana..... 31

LISTA DE GRÁFICOS

| | |
|--|-----------|
| Gráfico 5.1.1: Comparação da sobrevivência entre ratas Wistar dos grupos Seps e Etanol Seps 48 horas após a indução de seps | 34 |
| Gráfico 5.1.2: Avaliação do peso corporal entre os grupos Seps (n=20) e Etanol Seps (n=20) | 34 |
| Gráfico 5.1.3: Avaliação semanal do consumo de etanol em grama por quilo de peso corporal. | 35 |
| Gráfico 5.2.1: Avaliação do peso corporal entre os grupos C+S (n=32) e E+ES (n=37) | 36 |
| Gráfico 5.2.2: Avaliação semanal do consumo de etanol em grama por quilo de peso corporal | 36 |
| Gráfico 5.2.3: Níveis séricos de citocinas inflamatórias (TNF-α, IL6 e MIF) e anti-inflamatórias (IL10, TGF-β e IL13) dosadas pelo método de ELISA 8 horas após indução da seps. | 38 |
| Gráfico 5.2.4: Parâmetros bioquímicos (creatinina, uréia, albumina, glicose e proteínas totais) dosados por reagentes diagnósticos específicos 8 horas após indução da seps | 40 |
| Gráfico 5.2.5: Transaminases hepáticas (ALT e AST) dosadas por reagentes diagnósticos específicos através de punção cardíaca realizada 8 horas após indução da seps | 41 |
| Gráfico 5.2.6: Níveis de 17β- estradiol dosado pelo método de ELISA através de punção cardíaca realizada 8 horas após a indução séptica | 42 |
| Gráfico 5.3.1: Média das unidades formadoras de colônias na diluição 10⁻⁴ | 44 |

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.2.1 Variações correspondentes aos níveis séricos de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias dosadas pelo método de ELISA 8 horas após indução de sepse 39

Tabela 5.2.2 Variações correspondentes aos níveis séricos dos parâmetros bioquímicos dosados pelo método de ELISA 8 horas após indução de sepse .. 41

Tabela 5.2.3 Variações correspondentes aos níveis séricos do hormônio 17 β -estradiol dosado pelo método de ELISA 8 horas após indução de sepse 42

Tabela 5.2.4 Variações correspondentes à carga bacteriana obtida por coleta do lavado peritoneal 44

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

| | |
|--------------------|---|
| ADH | álcool desidrogenase |
| ALT | alanina aminotransferase |
| AST | aspartato aminotransferase |
| BSA | soro de albumina bovina |
| CID | coagulação intravascular disseminada |
| CLP | punção e ligação cecal |
| ELISA..... | Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay |
| EMB | eosina-azul de metileno lactose e sacarose |
| IL-6..... | interleucina 6 |
| IL-8..... | interleucina 8 |
| IL-10..... | interleucina 10 |
| IL-13..... | interleucina 13 |
| i.p. | intraperitoneal |
| LPS | lipopolissacarídeos |
| MIF | fator inibidor da migração de macrófagos |
| NAL | Núcleo de Animais de Laboratório |
| PBS | tampão fosfato salina (phosphate buffered saline) |
| RPM | rotações por minuto |
| SARA | síndrome da angústia respiratória do adulto |
| SIRS | síndrome da resposta inflamatória sistêmica |
| TGF β | fator de transformação do crescimento β |
| TMB..... | 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina |
| TNF α | fator de necrose tumoral α |
| TSA | triptina de soja (tryptic soy agar) |

UFC..... unidades formadoras de colônias

UTI unidade de terapia intensiva

GRUPOS EXPERIMENTAIS

Experimento 1

S grupo Sepsis
ES grupo Etanol Sepsis

Experimento 2

C grupo Controle
S grupo Sepsis
E grupo Etanol
ES grupo Etanol Sepsis

Experimento 3

C grupo Controle
S grupo Sepsis
E grupo Etanol
ES grupo Etanol Sepsis

Sumário

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 13 |
| 2 HIPÓTESE | 19 |
| 3 OBJETIVOS | 20 |
| 3.1 OBJETIVO GERAL | 20 |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 20 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS | 21 |
| 4.1 ANIMAIS | 21 |
| 4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL | 21 |
| 4.3 EXPERIMENTO 1 | 23 |
| 4.4 EXPERIMENTO 2..... | 24 |
| 4.4.1 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS | 26 |
| 4.4.2 CITOCINAS | 27 |
| 4.4.3 ESTROGÊNIOS | 28 |
| 4.5 EXPERIMENTO 3..... | 30 |
| 4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA | 32 |
| 5 RESULTADOS | 33 |
| 5.1 EXPERIMENTO 1 | 33 |
| 5.2 EXPERIMENTO 2..... | 35 |
| 5.3 EXPERIMENTO 3..... | 42 |
| 6 DISCUSSÃO | 45 |
| 7 CONCLUSÃO | 52 |
| 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 53 |

1 INTRODUÇÃO

O álcool é uma das drogas mais utilizadas no mundo. O consumo de mais de duas doses de bebidas alcoólicas por dia possui efeitos deletérios e está associado ao aumento de mortalidade (ESPER *et al.*, 2006). Além de interferir no desenvolvimento fetal, o consumo pesado de bebidas alcoólicas por alguns anos causa doenças hepáticas, hematológicas, pancreáticas, gastrointestinais, respiratórias, desnutrição e dependência química (EDWARD *et al.*, 1999; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

A associação entre a exposição ao álcool e o risco ao desenvolvimento de uma doença relacionada a seu uso é multifatorial e existe uma variação individual considerável quanto ao risco, com maior susceptibilidade no sexo feminino (DÍAZ *et al.*, 2002). Evidências epidemiológicas indicam que as conseqüências adversas do consumo de álcool, incluindo doença hepática severa como cirrose alcoólica, se desenvolvem mais rapidamente e requerem menores níveis de exposição ao álcool em mulheres do que em homens. Enquanto pelo menos quatro doses por dia são necessárias para aumentar o risco ao desenvolvimento de cirrose em homens, em mulheres, uma dose de bebida diária é suficiente. Essas observações são feitas levando-se em consideração o peso corporal, a distribuição de gordura, água corporal e outras variáveis (SCHENKER, 1997) como nível de enzimas como a álcool desidrogenase.

O etanol é uma molécula hidrófila, acumula-se em tecidos com maior teor de água e não se acumula em tecido adiposo. Como a mulher geralmente apresenta maior percentual de gordura corporal, isto faz com que sua alcoolemia seja maior que a de um homem após consumirem a mesma dose de etanol (SUTER *et al.*, 1992). Em relação ao seu metabolismo, este ocorre principalmente via álcool desidrogenase (ADH) e pela citocromo P450 2E1 (ZAKHARI, 2006) sendo as atividades de ambas as enzimas maior em homens que em mulheres (FRANCONI *et al.*, 2006), o que também permite que maiores concentrações de álcool possam ser detectadas em mulheres quando ocorre consumo da mesma dose.

O etanol é uma droga complexa e seus efeitos podem variar dependendo do estado imunológico, das doses consumidas, do sexo, da idade e do padrão de consumo (NELSON & KOLLS, 2002). O álcool possui vastos efeitos sobre o sistema imune incluindo diminuição da resposta de linfócitos a mitógenos, diminuição da quimiotaxia de neutrófilos e funções fagocíticas e alteração na produção de citocinas por linfócitos e macrófagos (COOK, 1998; JERRELLS *et al.*, 1990; KAWAKAMI *et al.*, 1990; MESSINGHAM *et al.*, 2002). Em estudos clínicos, já foi comprovado que pacientes alcoólatras possuem um risco duas a cinco vezes maior de morbidade após cirurgia que pacientes não alcoólatras. O consumo prolongado e excessivo de álcool demonstrou predispor os pacientes a uma variedade de infecções, o que pode ser devido, em parte, à incapacidade de produção de importantes citocinas (DOSSOW *et al.*, 2004). Considerando que o uso abusivo de álcool está relacionado ao maior risco a infecções, o aumento nesta predisposição entre pacientes com problemas em relação ao uso do álcool pode mediar a sepse (O`BRIEN *et al.*, 2007).

Apesar das recentes melhorias nos cuidados intensivos e surgimento de antibióticos, a sepse continua sendo associada a uma alta taxa de mortalidade. Apenas nos Estados Unidos, aproximadamente 700.000 pessoas são afetadas pela sepse anualmente, dentre as quais 210.000 morrem em decorrência desta síndrome (ANGUS & WAX, 2001). Além disso, pacientes sépticos geralmente são hospitalizados por longos períodos, levando a um custo médio de U\$ 50.000,00 por

paciente (CHALFIN *et al.*, 1993). A sepse é definida como síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) decorrente de infecção. O termo “sepse grave” refere-se à sepse associada à falência múltipla de órgãos (ABRAHAM *et al.*, 2000). Entre 20% e 50% dos pacientes sépticos morrem e, entre aqueles que sobrevivem, a sepse é associada com conseqüente redução da qualidade de vida (HOYERT *et al.*, 1999; PERL *et al.*, 1995). Por esta razão, muitos trabalhos têm sido dedicados à previsão de mortalidade nesta síndrome.

Na sepse, quando uma infecção bacteriana grave leva à presença de organismos e de lipopolissacarídeos (LPS) no sangue, os níveis de citocinas circulantes aumentam e a forma do hospedeiro de responder é alterada. Níveis elevados de citocinas produzidas em resposta aos lipopolissacarídeos podem resultar em coagulação intravascular disseminada (CID). Vários órgãos exibem inflamação e trombose intravascular, o que pode produzir a falência do órgão. A lesão tecidual em resposta ao LPS pode também resultar da ativação de neutrófilos antes que eles deixem a vasculatura, causando assim dano às células endoteliais e reduzindo o fluxo sangüíneo. Os pulmões e o fígado são particularmente susceptíveis à lesão por neutrófilos. O dano ao pulmão na SIRS é comumente denominado síndrome da angústia respiratória do adulto (SARA) e surge quando uma lesão endotelial mediada por neutrófilos permite o extravasamento de fluido do sangue para o espaço aéreo. A lesão ao fígado e o prejuízo da função hepática resultam em falha na manutenção dos níveis normais de glicose no sangue devido a uma deficiência da glicogenólise a partir do glicogênio armazenado. O rim e o intestino também são prejudicados, em grande parte como resultado da perfusão reduzida. A superprodução de óxido nítrico pelos miócitos cardíacos ativados por citocinas, e pelas células da musculatura lisa vascular leva à falência cardíaca e à perda da pressão de perfusão, respectivamente, resultando em choque hemodinâmico. A tríade clínica da coagulação intravascular disseminada (CID), hipoglicemia e falência cardiovascular é descrita como choque séptico. Essa condição é freqüentemente fatal (ABBAS & LICHTMAN, 2005).

Os fatores de risco para o choque séptico incluem idade avançada, presença de patógenos na corrente sangüínea, baixa contagem plaquetária, leucopenia ou leucocitose, baixa concentração de albumina, aumento nos níveis de enzimas hepáticas e alta concentração plasmática de creatinina (GRANSDEN *et al.*, 1990; AUBE *et al.*, 1992; PITTET *et al.*, 1995; LEIBOVICI *et al.*, 1997; SLOTMAN & QUINN, 1997), os quais são muito comuns em alcoólatras (FRANK *et al.*, 2004). Como o choque séptico é caracterizado por uma produção exacerbada de citocinas, estudos clínicos já foram realizados com agentes que bloqueiam a cascata inflamatória (ABRAHAM *et al.*, 1995; FISHER *et al.*, 1994) com o objetivo de diminuir a mortalidade entre pacientes sépticos. Entretanto, a morte por sepse não é sempre atribuída ao maior estímulo do sistema imune. Conforme a sepse persiste, existe uma mudança para um estado imunodepressivo caracterizado pelo aumento na liberação de citocinas anti-inflamatórias (LEDERER *et al.*, 1999; OBERHOLZER *et al.*, 2001).

Diversos estudos demonstraram que o trauma, com ou sem perda sangüínea, induz a disfunção imune, o que aumenta a susceptibilidade à sepse e falência múltipla de órgãos (AYALA *et al.*, 1996; GROTZ *et al.*, 1995; REMICK *et al.*, 2002; ZELLWEGGER *et al.*, 1995). Estudos laboratoriais e clínicos sugerem que o sexo é um fator significativo no prognóstico de pacientes após trauma e infecção, com melhores resultados geralmente encontrados em mulheres. A influência de hormônios sexuais na resposta imune já foi proposta como uma explicação para a desigual distribuição sexual na sepse (FRANCONI *et al.*, 2007). A hipótese é que estas diferenças possam ocorrer devido a capacidade do estrogênio em influenciar a resposta imune, inclusive, pelo fato de receptores de estrogênio poderem ser encontrados tanto no tecido reprodutor, como em células do sistema imune como linfócitos T, monócitos e macrófagos. Dessa forma, a modulação direta do sistema imune por estrogênio inclui mudanças na produção de citocinas, assim como ativação e proliferação celular (BIRD *et al.*, 2008).

Em geral, níveis fisiológicos de estrogênio, como aqueles encontrados

durante o ciclo menstrual e estral, estimulam a resposta imune, enquanto níveis muito elevados de estrogênio, como os que são encontrados durante a gravidez, deprimem a resposta imune mediada por células. Da mesma forma, a testosterona age como imunodepressor. Durante os anos reprodutivos, fêmeas possuem maior resposta imune celular e humoral que machos. A maior imunidade é evidenciada por timo mais desenvolvido, maior concentração de anticorpos e maior capacidade de rejeição de tumores e tecidos transplantados (OLSEN & KOVACS, 1996). Em um estudo envolvendo pacientes com trauma, mulheres apresentaram menores níveis de IL-6 e IL-8, o que foi associado com menor ocorrência de disfunção múltipla de órgãos e sepse (FRINK *et al.*, 2007). Em experimentos com animais os resultados são equivalentes aos estudos clínicos em relação ao provável efeito protetor do estrogênio. Em fêmeas, após punção e ligação cecal (CLP), a elevada resposta imune celular resultou em significativa maior habilidade em tolerar sepse em comparação a machos. A maior sobrevivência foi associada com a manutenção da função de esplenócitos em fêmeas em comparação a diminuição da função imune em machos sob estas condições (WICHMANN *et al.*, 1997). Os efeitos benéficos do estrogênio já foram observados também em homens que foram tratados com estrogênio como modalidade terapêutica (ANGELE *et al.*, 2000), apresentando melhores prognósticos.

A exposição crônica ao álcool é capaz de modular a expressão de estrogênio e testosterona. O efeito do álcool sobre a imunidade pode envolver mecanismos indiretos levando a variações na regulação do sistema imune pela alteração hormonal influenciada pelo álcool (KOVACS & MESSINGHAM, 2003). O aumento nos níveis plasmáticos de estrogênio já foi descrito em mulheres em consumo moderado a elevado de álcool (GILL, 2000; PUROHIT, 2000). Ainda não está claro se estas alterações hormonais resultam exclusivamente da aromatização de androgênios a estrogênios ou se elas derivam da exposição direta ao etanol (KOVACS *et al.*, 2004).

Tendo em vista que a variação dos níveis hormonais durante o ciclo estral pode influenciar a resposta imune e que o etanol é capaz de alterar os níveis de estrogênio, o qual é encontrado em maiores níveis na fase proestro do ciclo em ratos (OGLE *et al.*, 1977), poucos estudos são encontrados na literatura avaliando a susceptibilidade à sepse no sexo feminino quando se trata da comorbidade alcoolismo. Da mesma forma, apesar de diversos estudos sugerirem efeito benéfico do estrogênio após trauma e sepse, ainda não está claro se a terapia com estrogênio seria eficaz no tratamento destas complicações.

No presente estudo, foi realizado, primeiramente, um experimento de comparação da sobrevivência de animais em consumo subcrônico de álcool na concentração de 10% v/v (grupo Etanol Sepse) em relação a animais em consumo de água (grupo Sepse) após indução séptica. O segundo experimento avaliou a resposta inflamatória de animais em consumo de água e etanol, sépticos e não-sépticos através da dosagem de citocinas pró e anti-inflamatórias, dos parâmetros bioquímicos e níveis de estrogênio. Já o terceiro experimento comparou a formação de colônias bacterianas através de coleta e incubação de lavado peritoneal destes animais. Considerando-se que fêmeas apresentam os níveis mais baixos de estrogênio na fase estro do ciclo estral e níveis mais altos na fase proestro, em todos os experimentos foram utilizadas fêmeas na fase estro com o objetivo de evitar a interferência do desequilíbrio hormonal inicial dos animais sobre os resultados. A fase estro foi escolhida pois, se no momento da indução de sepse os animais já houvessem mudado de fase, esta seria realizada na fase diestro, na qual os níveis de estrogênio permanecem baixos.

Os estudos se complementam na avaliação das possíveis alterações fisiopatológicas do efeito do álcool na sepse em padrões de consumo subcrônico, onde foram fornecidas baixas doses de etanol aos animais de forma a evitar a interferência da desnutrição. Considerando a maior sensibilidade do sexo feminino aos efeitos tóxicos do etanol em razão de seu metabolismo diferenciado, torna-se relevante avaliar de que forma o uso desta droga é capaz de influenciar na resposta

do organismo a infecções em mulheres. Da mesma forma, diante de poucos estudos e da controvérsia ainda existente na literatura quanto à resposta inflamatória e orgânica à sepse na presença da comorbidade alcoolismo, este trabalho visa avaliar como o álcool influencia a resposta à sepse em decorrência da possível modulação do hormônio estrogênio.

2 HIPÓTESE

A exposição ao etanol é capaz de aumentar os níveis de estrogênio e a expressão de citocinas, modulando a resposta inflamatória e a resposta orgânica à sepse de forma acentuada no sexo feminino.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar a evolução da sepse após o consumo de etanol, em ratas na fase estro do ciclo estral.

3.2 ESPECÍFICOS

3.2.1 Comparar a taxa de mortalidade após a indução da sepse em animais controles e em consumo de etanol.

3.2.2 Avaliar a resposta imune inata quanto a expressão de citocinas pró-inflamatórias (TNF α , MIF, IL-6) e anti-inflamatórias (TGF β , IL-10 e IL-13).

3.2.3 Avaliar os parâmetros bioquímicos quanto aos níveis de creatinina, uréia, glicose, alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase, proteínas totais e albumina dos animais.

3.2.4 Avaliar os níveis de estrogênio dos animais que consumiram álcool e os controles, sépticos e não-sépticos.

3.2.5 Comparar o grau de formação de colônias bacterianas entre animais sépticos e não sépticos e em consumo de água e etanol a partir do lavado peritoneal.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Em ambos os experimentos, foram utilizados ratos fêmeas da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) com 45 dias provenientes da colônia do Biotério do Núcleo de Ciências Comportamentais e do Desenvolvimento do Instituto Biomédico da Universidade Federal Fluminense. As ratas foram mantidas em gaiolas individuais de polietileno (41x34x16 cm³) com grade de aço inoxidável a uma temperatura média de 22°C e expostas a 12 horas de ciclo claro-escuro (iniciando às 7:00h). A rotina experimental (pesagem das ratas, da ração e quantificação da solução de água e etanol consumida) foi realizada a cada dois dias pelas manhãs (em torno das 10:00h). Os procedimentos adotados para tratamento e cuidado dos animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (NAL) da Universidade Federal Fluminense sob o número de registro 00115-09.

4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para induzir o consumo subcrônico de álcool, os animais expostos ao etanol receberam, diariamente, 300 mL de solução de etanol (VETEC 95%[®]) a 10% (10 mL de etanol + 90 mL de água) durante as quatro semanas, conforme modelo experimental proposto por Macieira *et al* (1997) e Aguiar *et al* (2004 e 2006). O grupo controle recebeu 300mL de água. As soluções foram acondicionadas em garrafas de polietileno com bico de aço inox e capacidade de 350 mL. Para mensurar as soluções e seu consumo, foi utilizada proveta de vidro de 100 mL.

Após as quatro semanas, todos os animais foram avaliados diariamente em relação ao ciclo estral. Realizou-se esfregaço através de retirada de amostras de células vaginais com soro fisiológico. Após coloração com azul de metileno, foi realizada a observação das lâminas em microscópio ótico. As fases do ciclo estral foram determinadas pela avaliação da densidade celular da seguinte forma: diestro, predomínio de leucócitos e presença de células epiteliais nucleadas redondas e células epiteliais corneificadas; metaestro, leucócitos e células epiteliais nucleadas redondas, assim como poucas células epiteliais corneificadas; proestro, células epiteliais nucleadas redondas; e estro, células epiteliais corneificadas (ROBERTS *et al.*, 1998).

Neste trabalho foram apresentados os resultados da padronização de um modelo de sepse abdominal polimicrobiana realizado com o objetivo de reproduzir alguns dos aspectos da sepse em mulheres associado à comorbidade alcoolismo e à variação hormonal. O uso de reposição volêmica e antibioticoterapia foi um fator incluído no modelo, que podem ser considerado relevante na aproximação deste para a condição clínica. Além disso, o fato do modelo de injeção de fezes não envolver ato cirúrgico e nem o uso de anestésicos foi mais uma vantagem na realização do trabalho. Interpretamos que o uso do modelo CLP, o mais utilizado para estudo da sepse, poderia incluir fatores confundidores para o estudo, uma vez que inclui um procedimento cirúrgico e utiliza anestésicos para a analgesia/anestesia. Por esta mesma razão, optou-se pela não-realização da ovariectomia de forma a evitar o estresse que poderia ser causado aos animais em decorrência do procedimento cirúrgico. Assim, os experimentos foram realizados apenas em animais nas fases estro do ciclo estral, na qual os níveis de estrogênio estão mais baixos em relação às outras fases do ciclo (CHAMPLIN *et al.*, 1973) de forma que não ocorresse a interferência da variável estresse que poderia alterar os resultados.

Dessa forma, os animais que se encontravam na fase estro do ciclo sofreram indução de sepse pelo método de injeção de fezes frescas no peritônio. Esta técnica pode ser considerada relevante do ponto de vista clínico por mimetizar diversos aspectos da sepse polimicrobiana em humanos, pois o processo se inicia a partir do foco infeccioso ou da disseminação de lipopolissacarídeos administrados na cavidade peritoneal (BENJAMIM, 2001; BREALEY, 2003; BARROS *et al.*, 2011).

A injeção de fezes intraperitoneal é um modelo que se assemelha ao modelo CLP por produzir sepse polimicrobiana, porém sem precisar do uso de anestésicos ou de procedimento cirúrgico. É um modelo pouco utilizado por haver relatos de causar sepse rapidamente, levando a morte ou recuperação do animal em pouco tempo (RITTIRSCH *et al.*, 2007), seguindo o padrão do modelo de endotoxemia. No entanto, já foi relatado que com o uso de reposição volêmica e antibiótico, o modelo de injeção de fezes é capaz de produzir peritonite e sepse com características semelhantes à do ser humano, inclusive com disfunção orgânica múltipla (BREALEY *et al.*, 2004).

Para o preparo da solução a ser injetada, animais independentes foram sacrificados para a retirada de fezes do intestino grosso. A coleta foi realizada em tubo cônico de polipropileno para centrífuga, capacidade de 50 mililitros (são coletados 5 miligramas de fezes para cada 100 gramas do animal). Em seguida, foi adicionado soro fisiológico (0,9% NaCl) para diluição das fezes (15 mililitros de soro fisiológico para cada 5000 miligramas de fezes) e a solução obtida foi centrifugada a 800 rotações por minuto (rpm) durante 5 minutos. Do sobrenadante obtido, foi retirado 1ml da solução para cada 100g do rato para ser injetado intraperitonealmente.

4.3 EXPERIMENTO 1: CONSUMO SUBCRÔNICO DE ETANOL E ANÁLISE DE SOBREVIDA

No experimento 1 os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos: Sepse (S – n=20) e Etanol Sepse (ES – n=20), com peso médio equivalente a 158 gramas recebendo, respectivamente, água *ad libitum* e solução de etanol a 10% como única fonte líquida. Ambos os grupos receberam ração comercial Nuvilab CR1 (NUVITAL®) durante todo o experimento. Após as quatro semanas, foi feita verificação do ciclo estral e indução de sepse em animais nas fases estro do ciclo. Após cerca de 8 horas da indução de sepse, quando os animais já apresentavam sinais de sepse (pêlo eriçado, hipotermia, lacrimejamento, letargia) foi injetada a associação dos antibióticos imipinem (500mg) e cilastatina (500mg) na dose de 8 mg/kg, subcutâneo com o objetivo de aumentar a sobrevivência dos animais. Os animais foram observados após indução séptica a intervalos de 8 horas até 48 horas.

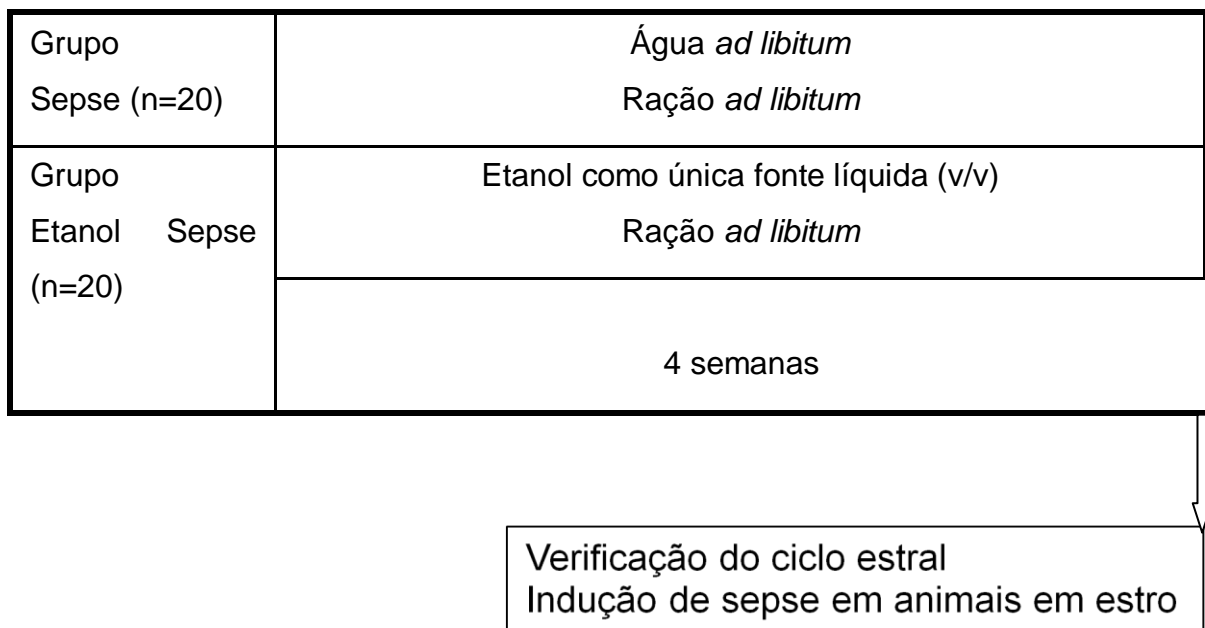


Figura 4.3.1 Experimento 1: esquema das quatro semanas de consumo de água (grupo S) e etanol a 10% v/v (grupo ES) seguidas da indução de sepse.

4.4 EXPERIMENTO 2 - CONSUMO SUBCRÔNICO DE ETANOL E RESPOSTA IMUNE NA SEPSE

No experimento 2, foram utilizadas ratas Wistar com peso médio equivalente a 185 gramas para avaliar o efeito do consumo subcrônico de etanol na

sepsis experimental através da quantificação dos parâmetros bioquímicos e dos níveis de citocinas e estrogênio produzidos. Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos:

Grupo Controle (C) (n=12): receberam água *ad libitum* como única fonte líquida e ração comercial NUVILAB CR1(NUVITAL[®]) *ad libitum* durante quatro semanas e receberam injeção de solução salina por via intraperitoneal;

Grupo Etanol (E) (n=12): receberam solução de etanol a 10% v/v como única fonte líquida e ração comercial NUVILAB CR1(NUVITAL[®]) *ad libitum* durante quatro semanas e receberam injeção de solução salina por via intraperitoneal;

Grupo Sepsis (S) (n=20): receberam água *ad libitum* e ração comercial NUVILAB CR1(NUVITAL[®]) *ad libitum* durante quatro semanas e sofreram indução de sepsis;

Grupo Etanol Sepsis (ES) (n=25): receberam solução de etanol a 10% v/v durante quatro semanas como única fonte líquida e ração comercial NUVILAB CR1(NUVITAL[®]) *ad libitum* durante quatro semanas e sofreram indução de sepsis.

Os animais dos grupos Controle e Etanol passaram por verificação do ciclo estral ao final das quatro semanas. Em seguida, os animais em estro tiveram o sangue coletado por punção cardíaca 8 horas após injeção de solução salina via intraperitoneal (i.p.) Os animais dos grupos Sepsis e Etanol Sepsis passaram pelo mesmo procedimento de verificação do ciclo estral após as quatro semanas, sendo que os animais em estro tiveram o sangue coletado 8 horas depois da indução da sepsis. Para a realização do procedimento de punção cardíaca, os ratos foram sacrificados através da anestesia com cetamina (112,5mg/kg) e xilazina (7,5mg/kg) pela via i.p. e tiveram o sangue coletado. Os soros foram obtidos através de centrifugação a 2250 RPM por 15 minutos sob refrigeração (5°C).

4.4.1 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

As análises bioquímicas foram realizadas no Laboratório da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense em espectrofotômetro semi-automatizado da marca Bioplus – modelo BIO2000. Foram realizadas as análises dos seguintes parâmetros bioquímicos: ALT (alanina aminotransferase), AST (aspartato aminotransferase), albumina, creatinina, glicose, proteínas totais e uréia.

DOSAGEM DAS TRANSAMINASES

- ALT (Alanina Aminotransferase)

A dosagem dos níveis séricos de ALT foi realizada por método cinético utilizando conjunto de reagentes diagnósticos da marca Labtest Ltda (Ref.108). A leitura foi realizada em 340 nm e os resultados expressos em U.I.

- AST (Aspartato Aminotransferase)

A dosagem dos níveis séricos de AST foi realizada por método cinético utilizando conjunto de reagentes diagnósticos da marca Labtest Ltda (Ref.109). A leitura foi realizada em 340 nm e os resultados expressos em U.I.

DOSAGEM DE ALBUMINA

A determinação da albumina sérica foi realizada por método colorimétrico utilizando conjunto de reagentes diagnósticos da marca Labtest Ltda (Ref.19). A leitura foi realizada em 630 nm e os resultados expressos em mg/dL.

DOSAGEM DE CREATININA

A determinação dos níveis séricos de creatinina foi realizada por método colorimétrico utilizando conjunto de reagentes diagnósticos da marca Labtest Ltda (Ref.35). A leitura foi realizada em 510 nm e os resultados expressos em mg/dL.

DOSAGEM DE URÉIA

A dosagem de uréia foi realizada por método enzimático utilizando conjunto de reagentes diagnósticos da marca Labtest Ltda (Ref.104). A leitura foi realizada em 340 nm e os resultados expressos em mg/dL.

DOSAGEM DE GLICOSE

A dosagem de glicose foi realizada por método colorimétrico utilizando conjunto de reagentes diagnósticos da marca Labtest Ltda (Ref.84). A leitura realizada em 505 nm e os resultados expressos em mg/dL.

DOSAGEM DE PROTEÍNAS TOTAIS

A determinação dos níveis séricos de proteínas totais foi realizada por método colorimétrico utilizando conjunto de reagentes diagnósticos da marca Labtest Ltda (Ref.99). A leitura realizada em 545 nm e os resultados expressos em mg/dL.

4.4.2 CITOCINAS

A dosagem de citocinas foi realizada no Departamento de Fisiologia e Farmacodinâmica do Instituto Oswaldo Cruz. Níveis de citocinas pró-inflamatórias (TNF α , IL-6 e MIF) e anti-inflamatórias (TGF β , IL-10 e IL-13) presentes no soro foram quantificados pelo método de ELISA (Duo set Kit da R&D systems). Foram utilizados 50 μ L de soro para dosagem de cada citocina.

O ELISA foi realizado em três dias consecutivos. No primeiro dia foi aplicado 50 μ L do anticorpo de captura (diluído em PBS a uma concentração final de 2 μ g/mL) correspondente a cada citocina por poço em placa de 96 poços. No segundo dia, os poços foram lavados com PBS/tween a 0,05% para remoção dos anticorpos não aderentes à superfície da placa. Esse procedimento foi seguido do bloqueio com PBS com 2% de Soro de Albumina Bovina (BSA) por cerca de uma hora, a temperatura ambiente. O bloqueio é realizado para evitar que ocorram ligações inespecíficas. Após o bloqueio a placa foi lavada novamente por três vezes com PBS/tween a 0,05%. Em seguida foram aplicadas as amostras e a citocina

recombinante diluída de forma seriada em cada poço da placa, de forma a reproduzir uma curva padrão com concentração de 0,01 a 10 ng/mL. No dia seguinte, a placa foi lavada por quatro vezes com PBS/tween a 0,05% e, posteriormente, foi aplicado o anticorpo de detecção correspondente às citocinas analisadas biotinilado da BD pharmingen. Após 1 hora a placa foi lavada seis vezes com PBS tween a 0,05%, e foi aplicada a estreptavidina conjugada à peroxidase, a qual se liga à biotina. Meia hora depois, a placa foi lavada 8 vezes com PBS/tween a 0,05%, e foi colocada a solução de TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina) da sigma, que é o substrato da peroxidase. Após este procedimento ocorre uma reação que gera uma coloração azul que pode ser lida no comprimento de onda de 370 ou 655nm. No entanto, nós utilizamos uma solução de bloqueio da reação enzimática com ácido sulfúrico a 12 N, que foi lida no comprimento de onda de 450 nm em leitora de microplacas. Os dados foram analisados utilizando o programa Softmax Pro 5.

4.4.3 ESTROGÊNIOS

A dosagem de estrogênio foi realizada no Laboratório de Fisiologia e Farmacodinâmica da Fundação do Instituto Oswaldo Cruz. Níveis plasmáticos de 17 β -estradiol foram quantificados em 100 μ L de soro coletado por punção cardíaca para a análise de estrogênio por ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando anticorpos monoclonais específicos, conforme instruções dos fabricantes (Estradiol-17 β Serum/Plasma EIA Kit - Stressgen catalog #900-174).

O ELISA foi realizado em um dia, apenas. Inicialmente, foram aplicados 150 μ L da solução tampão em um dos poços da placa de 96 poços para a ligação inespecífica. Posteriormente, foram adicionados 100 μ L da solução padrão 17 β -Estradiol, a qual foi diluída na solução tampão até a concentração final de 15,6 pg/mL, em 7 poços da mesma placa. Após a adição do padrão, 100 μ L de soro de 64 animais foram adicionados em cada poço. O conjugado 17 β -Estradiol, uma solução azul de 17 β -Estradiol conjugada à fosfatase alcalina foi adicionada em todos os poços com exceção do branco e do anticorpo 17 β -Estradiol. Uma solução amarela de conjugação de anticorpo policlonal ao 17 β -Estradiol, foi adicionada também a

todos os poços com exceção do branco (TA) e do local de ligação inespecífica. Em seguida, a placa foi incubada a temperatura ambiente sob agitação (500 rpm) por 2 horas. Após a incubação, os poços passaram por 3 etapas de lavagem com 400 μ L de solução salina tampão contendo detergente. Após a etapa de lavagem, 5 μ L do conjugado azul foram adicionados ao branco e 200 μ L do substrato, uma solução de p-nitrofenil fosfato, foram adicionados em cada poço. A placa foi então incubada a temperatura ambiente durante uma hora sem agitação e 50 μ L da solução de parada, uma solução de fosfato trisódico em água foi, então, adicionada em cada poço. A placa foi lida no comprimento de onda de 405 nm em leitora de microplacas e os dados foram analisados utilizando o programa Softmax Pro 5.

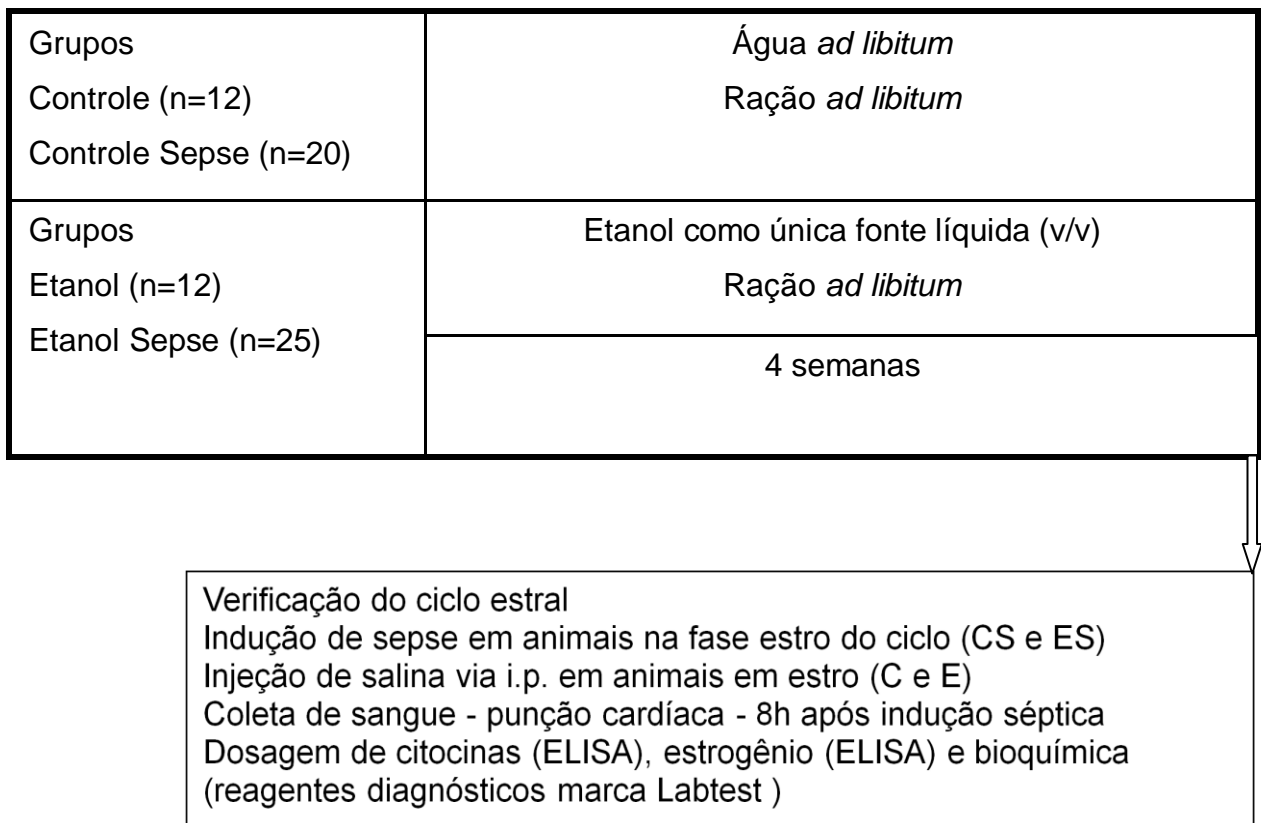


Figura 4.4.1 Experimento 2: esquema das quatro semanas de consumo de água (grupos C e CS) e etanol a 10% v/v (grupos E e ES) seguidas da indução de sepsis (CS e ES) e injeção de salina via i.p. (C e E) e coleta de sangue para dosagens.

4.5 EXPERIMENTO 3: QUANTIFICAÇÃO DA CARGA BACTERIANA A PARTIR DE COLETA DO LAVADO PERITONEAL

Neste experimento, dez animais com peso médio equivalente a 198 gramas foram divididos nos seguintes grupos:

Controle (C) (n=1): recebeu água *ad libitum* e ração comercial NUVILAB CR1(NUVITAL[®]) *ad libitum* durante as 4 semanas de experimento. Receberam injeção de solução salina via i.p.;

Etanol (E) (n=1): recebeu solução de etanol a 10% v/v e ração comercial NUVILAB CR1(NUVITAL[®]) *ad libitum* durante as 4 semanas de experimento. Receberam injeção de solução salina via i.p.;

Sepse (S) (n=4): receberam água *ad libitum* e ração comercial NUVILAB CR1(NUVITAL[®]) *ad libitum* durante as 4 semanas de experimento. Sofreram indução de sepse;

Etanol Sepse (ES) (n=4): receberam solução de etanol a 10% e ração comercial NUVILAB CR1(NUVITAL[®]) *ad libitum* durante as 4 semanas de experimento. Sofreram indução de sepse.

Após as quatro semanas foi realizada a indução de sepse e os animais foram sacrificados em procedimento equivalente ao experimento 2. Após oito horas, foram injetados 3 mL de solução salina na cavidade peritoneal de todos os animais. O lavado peritoneal de cada animal foi coletado em seguida da injeção e inserido em 1 mL de PBS em tubos cônicos estéreis de vidro. Para a análise do crescimento bacteriano, foram utilizadas placas de Petri contendo o meio de cultura EMB ágar (eosina-azul de metileno lactose e sacarose). Em cada placa foram feitas quatro divisões nas quais foram pipetadas 10 µL das soluções do lavado peritoneal de cada animal sem diluição e nas diluições 10^{-2} , 10^{-4} e 10^{-6} . As placas foram incubadas em

estufa a 37 °C por 24 horas. Em seguida, o crescimento bacteriano foi avaliado através de unidades formadoras de colônias (UFC) utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{UFC} = n^{\circ} \text{ colônias} \times \text{diluição} / 10 \mu\text{L}$$

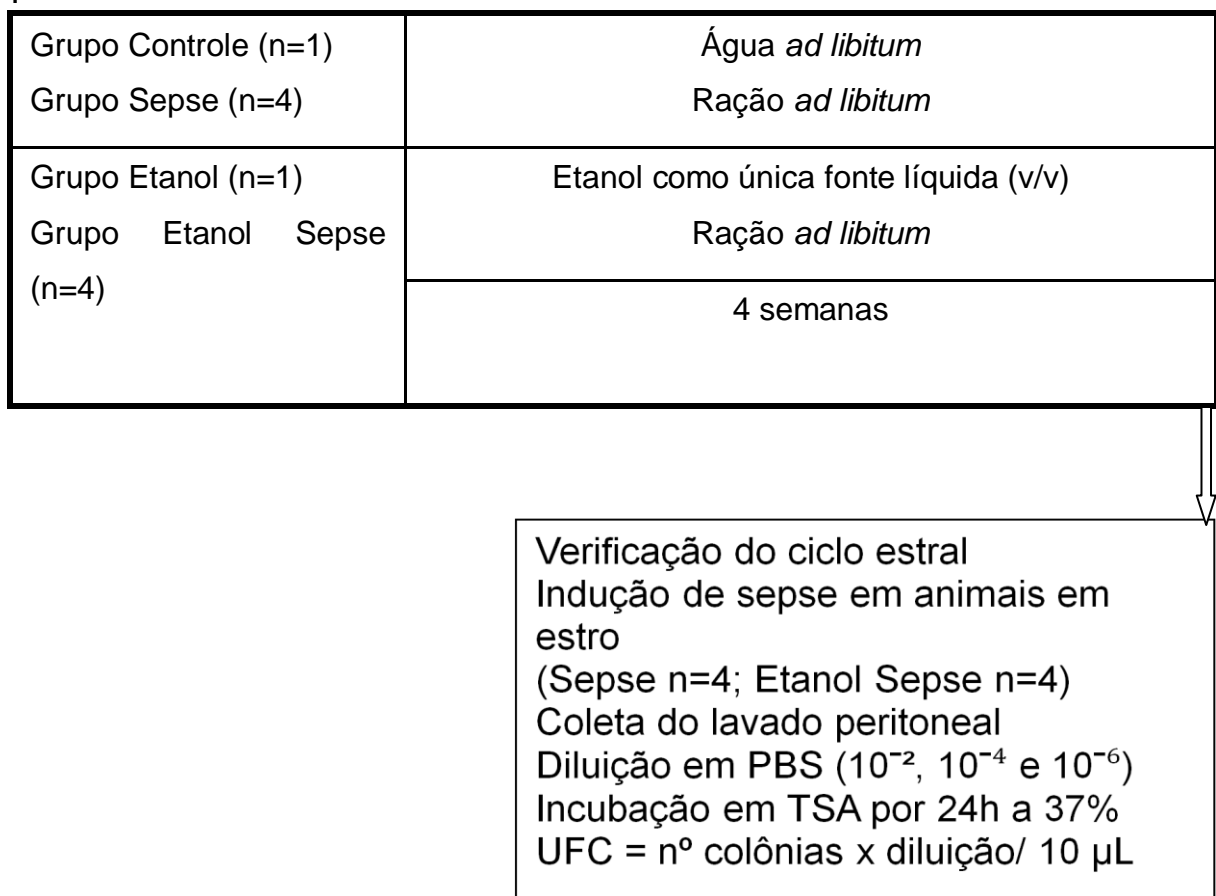


Figura 4.5.1 Experimento 3: esquema das quatro semanas de consumo de água (grupos C e CS) e etanol a 10% v/v (grupos E e ES) seguidas da indução de sepsis (CS e ES) e injeção de salina via i.p. (C e E) e coleta de lavado peritoneal para quantificação bacteriana

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados com auxílio do programa Prism 4.0. Os dados foram apresentados em média \pm desvio padrão ou valores máximo e mínimo. A análise de variância de um fator (ANOVA One Way) seguida do teste t-Student foi utilizada para comparar dados de peso corporal. O teste Log-rank foi utilizado para a análise de sobrevida. Os testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney foram utilizados para a comparação entre os grupos dos níveis de citocinas, estrogênio e bioquímica. O nível de significância foi fixado em 5%.

5 RESULTADOS

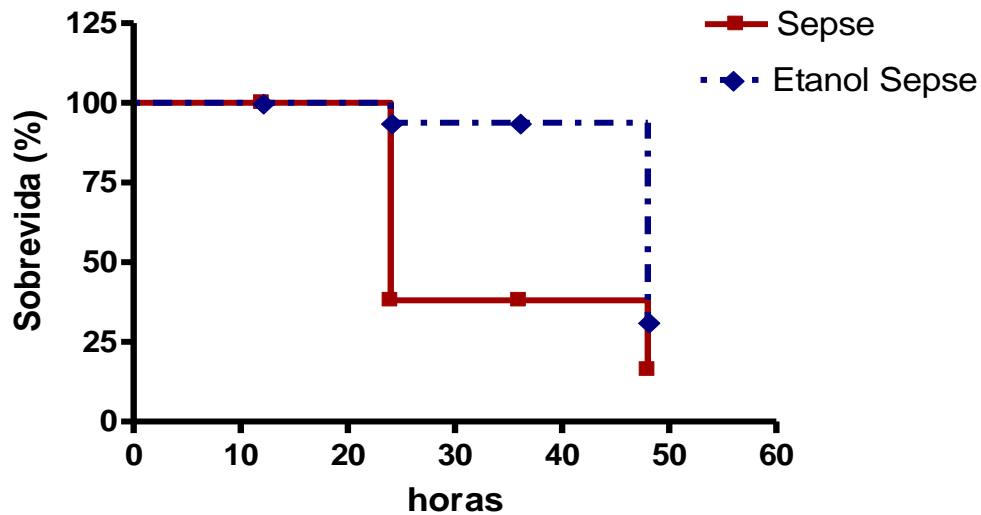
5.1 EXPERIMENTO 1: CONSUMO SUBCRÔNICO DE ETANOL E ANÁLISE DE SOBREVIDA

Após 24 horas da indução de sepse, 13 animais do grupo Sepse (65%) e 2 animais do grupo Etanol Sepse (10%) haviam morrido. Após 48 horas, a mortalidade total correspondia a 17 animais no grupo Sepse (85%) e 14 animais no grupo Etanol Sepse (70%) (Gráfico 5.1.1).

Não houve alteração do peso corporal pelo etanol (Peso Médio Sepse: $201,4 \pm 23,8$; Etanol Sepse: $184,4 \pm 23,7$ gramas, $p > 0,05$, teste t de Student). Durante as quatro semanas de consumo de água e indução do consumo subcrônico de etanol, houve ganho de peso em todos os grupos analisados. Não houve diferença significativa de peso entre os grupos até o final do experimento (gráfico 5.1.2).

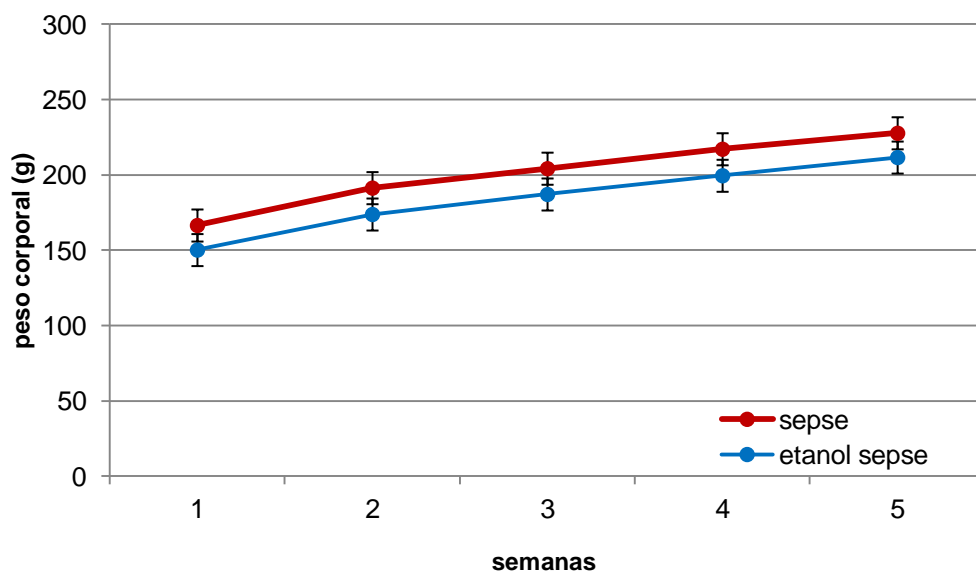
O consumo diário de etanol foi em média $10,9 \pm 1,9$ g/kg (Gráfico 6.1.3).

Gráfico 5.1.1: Comparação da sobrevivência entre ratos Wistar dos grupos Sepses e Etanol Sepses 48 horas após a indução de sepsis.



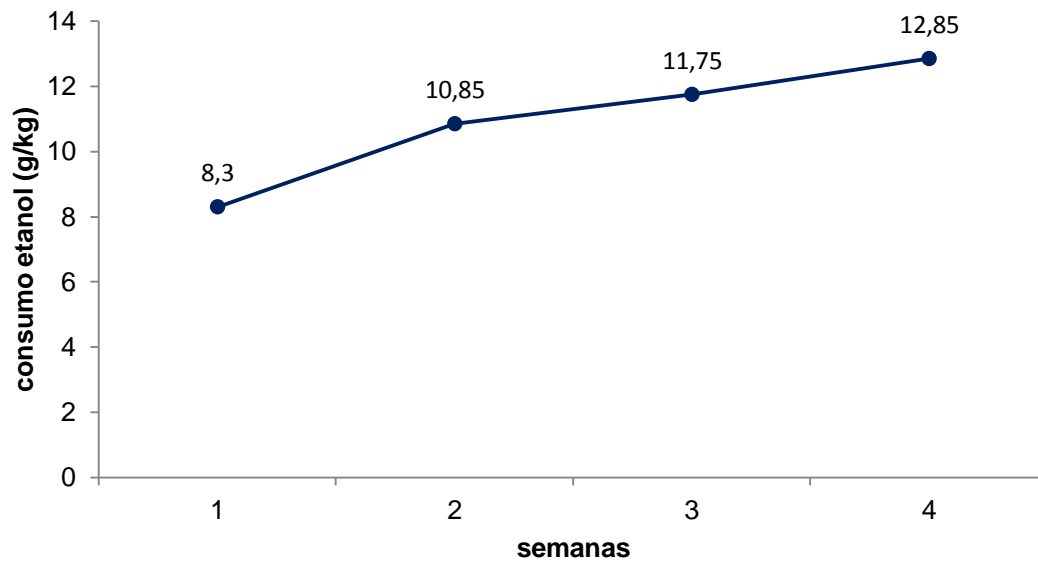
$P=0,0008$ quando comparada a mortalidade do grupo S em relação ao grupo ES utilizando o parâmetro 48 horas (teste do qui quadrado - Logrank).

Gráfico 5.1.2: Avaliação do peso corporal entre os grupos Sepses ($n=20$) e Etanol Sepses ($n=20$). Cada ponto da curva corresponde à média de peso de 20 animais a cada semana.



Peso Final S: 227 ± 18 ; ES: 211 ± 13 g

Gráfico 5.1.3: Avaliação semanal do consumo de etanol em grama por quilo de peso corporal. Cada ponto da curva corresponde à média de consumo de 20 animais a cada semana. O consumo diário de etanol foi em média $10,9 \pm 1,9$ g/kg.



5.2 EXPERIMENTO 2: CONSUMO SUBCRÔNICO DE ETANOL E RESPOSTA IMUNE NA SEPSE

Assim como no experimento 1, não houve alteração do peso corporal pelo etanol (Peso Médio Controle (C + S): $209,8 \pm 30,8$; Etanol (E + ES): $198,7 \pm 23,2$ gramas, $p > 0,05$, teste t de Student). Houve ganho de peso em todos os grupos analisados durante as quatro semanas de consumo de água e indução do consumo subcrônico de etanol. Não houve diferença significativa de peso entre os grupos até o final do experimento (gráfico 5.2.1).

O consumo diário de etanol foi em média $11,7 \pm 3$ g/kg (Gráfico 5.2.2).

Gráfico 5.2.1: Avaliação do peso corporal entre os grupos C+S (n=32) e E+ES (n=37). Cada ponto da curva corresponde à média de peso de cada grupo de animais a cada semana. Peso Médio C+S: $209,8 \pm 30,8$; E+ES: $198,7 \pm 23,2$ g

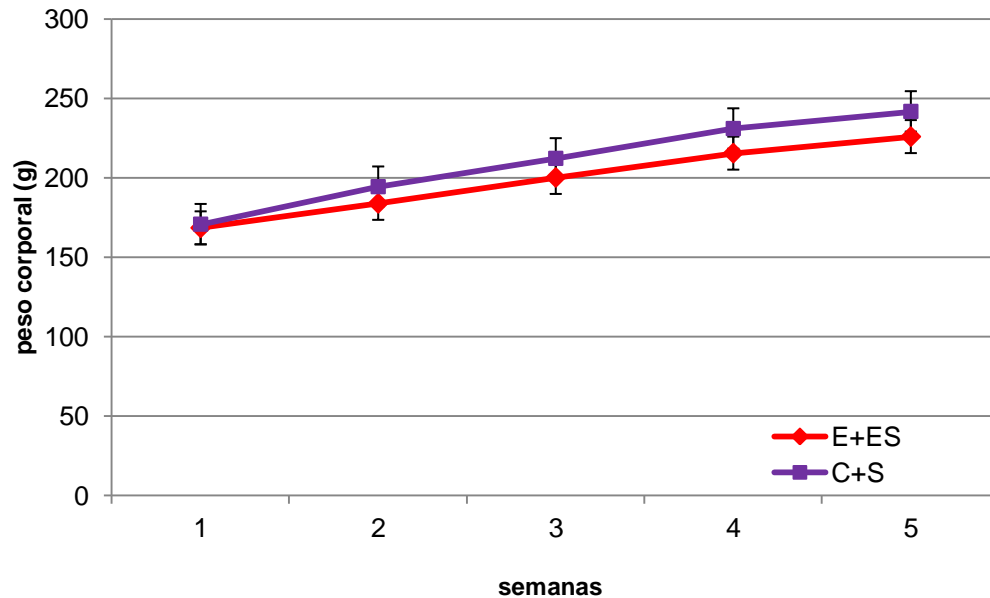
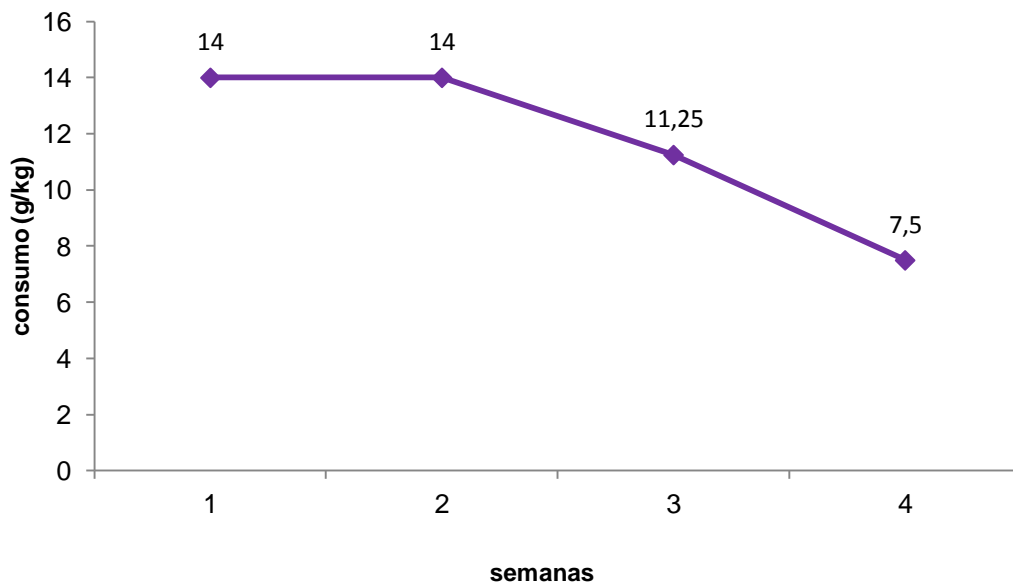


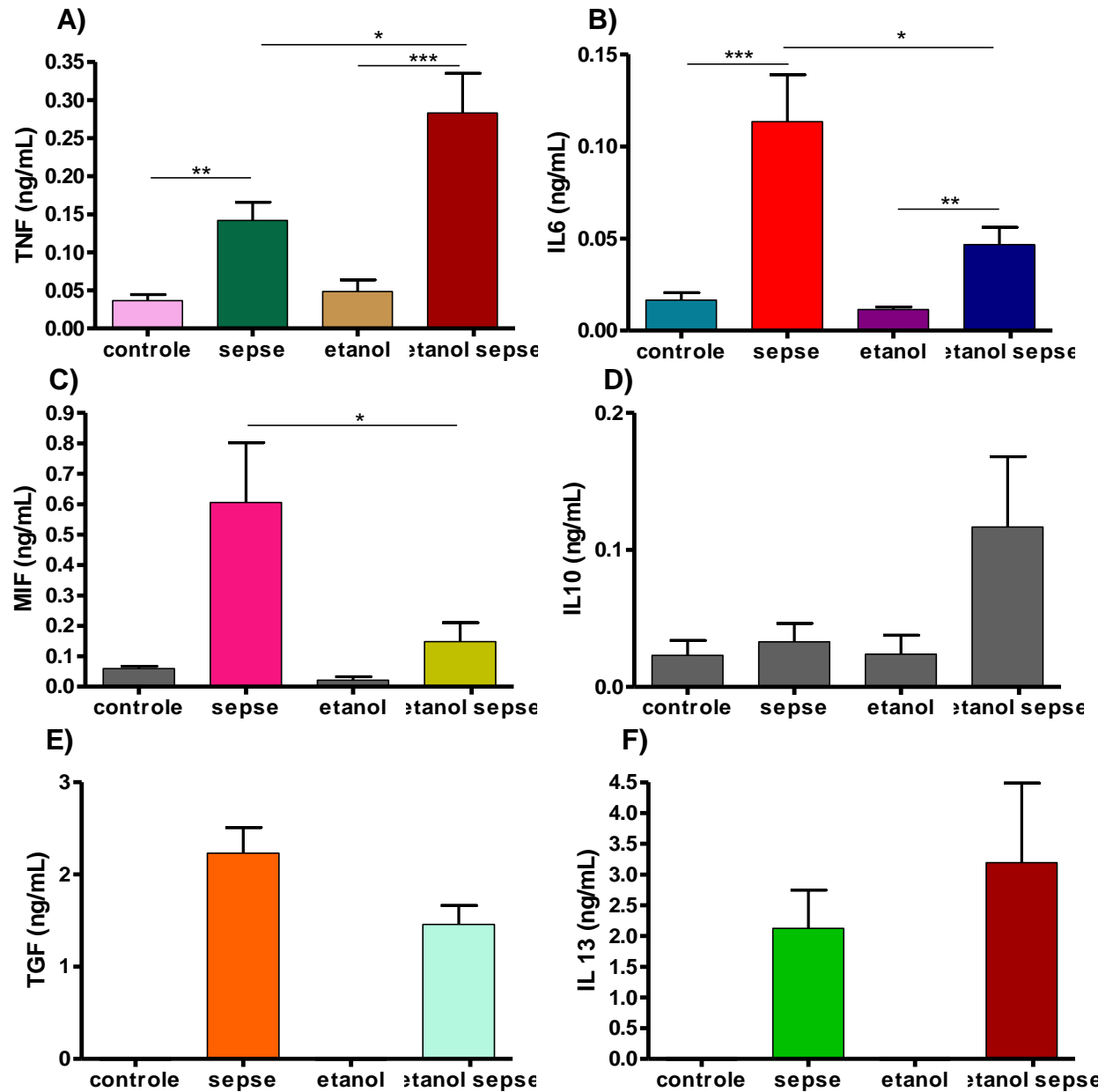
Gráfico 5.2.2: Avaliação semanal do consumo de etanol em grama por quilo de peso corporal. Cada ponto da curva corresponde à média de consumo de 37 animais a cada semana. O consumo diário de etanol foi em média $11,7 \pm 3$ g/kg.



A resposta inflamatória foi avaliada a partir da comparação entre os níveis de citocinas no soro entre animais dos grupos Controle, Sepse, Etanol e Etanol Sepse. A análise de soro revelou que em 8h, após a indução de sepse houve aumento significativo nos níveis de TNF- α (gráfico 5.2.3 - A) no grupo Sepse ($0,1419 \pm 0,089$ ng/mL) em relação ao grupo Controle ($0,0364 \pm 0,0239$ ng/mL), no grupo Etanol Sepse ($0,283 \pm 0,1566$ ng/mL) em relação ao grupo Etanol ($0,0484 \pm 0,046$ ng/mL) e no Etanol Sepse em relação ao Sepse. Em relação a IL-6 (gráfico 5.2.3 - B), foi observado que, assim como no TNF- α , a sepse elevou o nível desta citocina, havendo diferença significativa do grupo Controle ($0,01658 \pm 0,01394$ ng/mL) em relação ao Sepse ($0,1135 \pm 0,0949$ ng/mL) e no grupo Etanol ($0,0484 \pm 0,0461$) em relação ao grupo Etanol Sepse ($0,04668 \pm 0,0374$ ng/mL). Entretanto, ao contrário do TNF- α , houve diminuição desta citocina no grupo Etanol Sepse em relação ao grupo Sepse .

Quanto à citocina MIF (gráfico 5.2.3 - C), apesar de ter havido aumento desta na sepse, tanto entre os animais que consumiram água quanto entre os que consumiram etanol, estes resultados não foram significativos. Foi observada uma diminuição significativa nos níveis desta citocina apenas no grupo Etanol Sepse ($0,1483 \pm 0,2318$ ng/mL) em relação ao grupo Sepse ($0,6053 \pm 0,6513$ ng/mL). Em relação às citocinas anti-inflamatórias IL-10, TGF- β e IL-13, não foi encontrada diferença estatística significativa entre os grupos. Em resumo, houve aumento de TNF- α e diminuição de MIF e IL-6 como consequência do consumo de etanol em animais sépticos e aumento dessas citocinas pela sepse tanto nos animais em consumo de água quanto de etanol.

Gráfico 5.2.3: Níveis séricos de citocinas inflamatórias (TNF- α , IL6 e MIF) e anti-inflamatórias (IL10, TGF- β e IL13) dosadas pelo método de ELISA 8 horas após indução da sepse.



Grupos Controle (n=12) e Sepse (n=20) receberam água e os grupos Etanol (n=12) e Etanol Sepse (n=25) receberam solução de etanol 10% v/v durante quatro semanas. Kruskal Wallis TNF- α p<0,0001; IL-6 p<0,0001; MIF p=0,041; IL-10 p=0,5859. Mann Whitney TGF p=0,1535; IL13 p=0,6282. TNF: * p=0,0198; ** p=0,0042; *** p<0,0001. MIF: * p=0,0264. IL6: * p=0,0438; ** p=0,0026; *** p=0,0005.

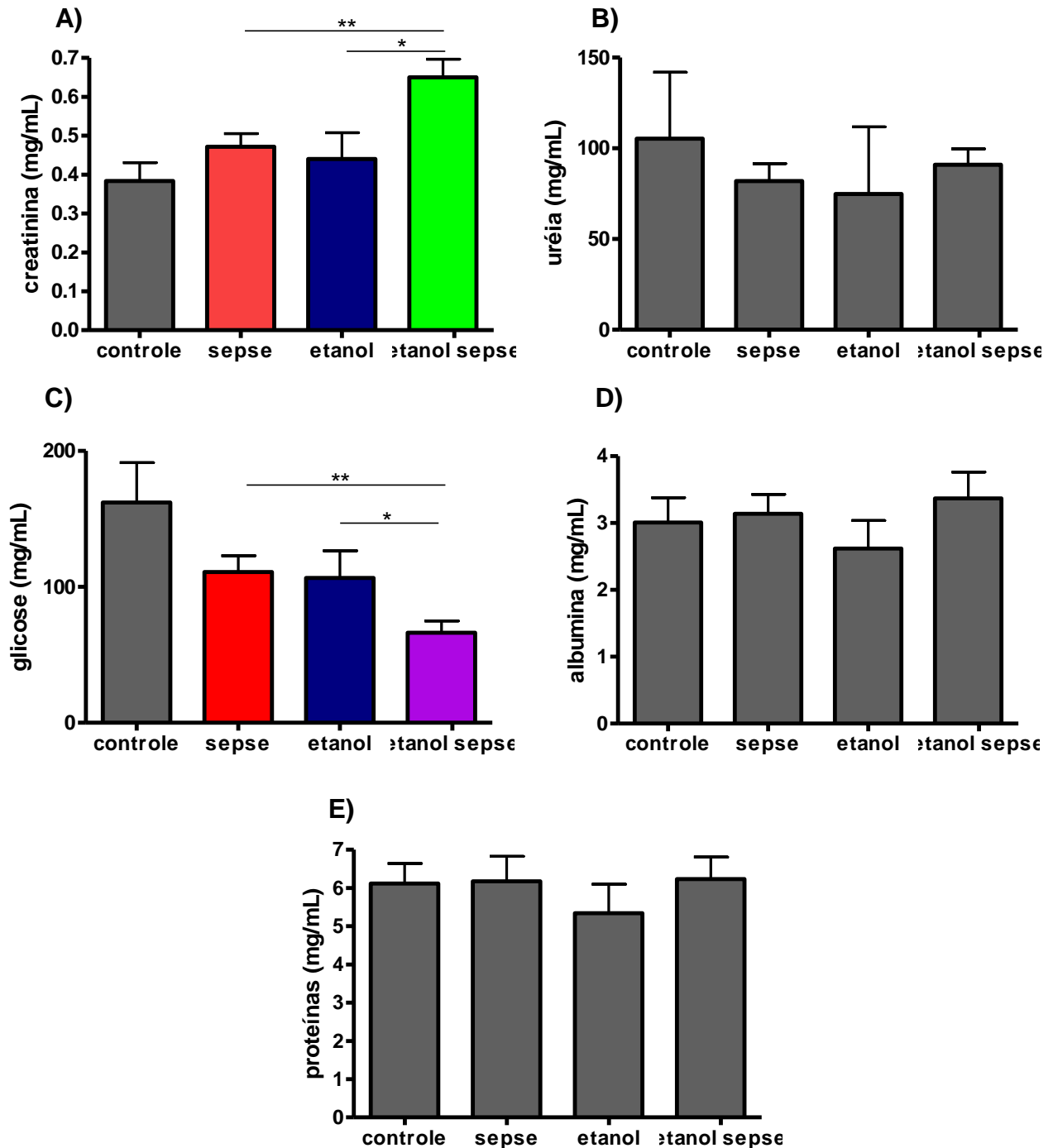
Tabela 5.2.1 Variações correspondentes aos níveis séricos de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias dosadas pelo método de ELISA 8 horas após indução de sepse, utilizando como parâmetro o grupo Controle.

| Citocinas | Sepse | Etanol | Etanol Sepse |
|-----------|-------|--------|--------------|
| IL6 | ↑↑ | ↓↓ | ↑ |
| TNF | ↑ | ↓ | ↑↑ |
| MIF | ↑↑ | ↓↓ | ↑ |
| IL10 | ↑ | ↓↓ | ↑↑ |
| TGF | ↑ | ----- | ↓ |
| IL13 | ↓ | ----- | ↑ |

Nos parâmetros bioquímicos, houve aumento dos níveis de creatinina (gráfico 5.2.4 A) no grupo Etanol Sepse ($0,65 \pm 0,19$ mg/mL) em relação aos grupos Etanol ($0,44 \pm 0,15$ mg/mL) e Sepse ($0,47 \pm 0,12$ mg/mL), demonstrando alteração de função renal causada pela sepse e pelo consumo de etanol. Em relação à função hepática, a dosagem de alanina aminotransferase (ALT) (gráfico 5.2.5 A) revelou aumento nos níveis desta enzima no grupo Etanol Sepse ($131,2 \pm 66,5$ U.I.) em relação ao grupo Etanol ($46 \pm 21,2$ U.I.). Já a dosagem da enzima aspartato aminotransferase (AST) (gráfico 5.2.5 B) revelou aumento da enzima no grupo Etanol Sepse ($539,1 \pm 135,8$ U.I.) em relação ao grupo Sepse ($336,1 \pm 161,6$ U.I.).

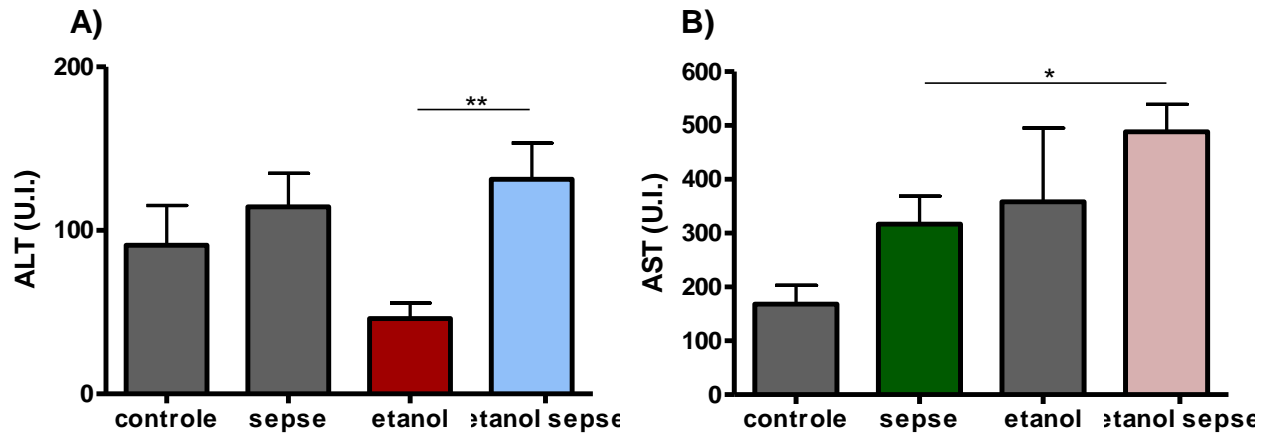
Foi observada também uma diminuição significativa nos níveis de glicose (gráfico 5.2.4 C) do grupo Etanol Sepse ($66,3 \pm 31,2$ mg/mL) em relação ao grupo Etanol ($106,6 \pm 46,6$ mg/ml) e em relação ao grupo Sepse ($110,9 \pm 43,1$ mg/ml). Apesar de ter ocorrido uma aparente diminuição nos grupos Sepse e Etanol em relação ao Controle ($162 \pm 72,1$ mg/mL), esta diferença não foi estatisticamente significativa (Sepse/ Controle $p=0,0873$; Etanol/ Controle $p=0,1255$, Mann Whitney). Não foi observada diferença estatística significativa entre os grupos em relação aos parâmetros uréia, proteínas totais e albumina.

Gráfico 5.2.4: Parâmetros bioquímicos (creatinina, uréia, albumina, glicose e proteínas totais) após 8 horas da indução da sepse.



Grupos Controle (n=12) e Sepse (n=20) receberam água e os grupos Etanol (n=12) e Etanol Sepse (n=25) receberam solução de etanol 10% v/v durante quatro semanas. Creatinina: *p=0,0276; ** p=0,0097, Glicose: * p=0,0385; ** p=0,0077; Mann Whitney.

Gráfico 5.2.5: Transaminases hepáticas (ALT e AST) após 8 horas da indução da sepse.



ALT: ** p=0,007, AST: * p=0,0288, Mann Whitney.

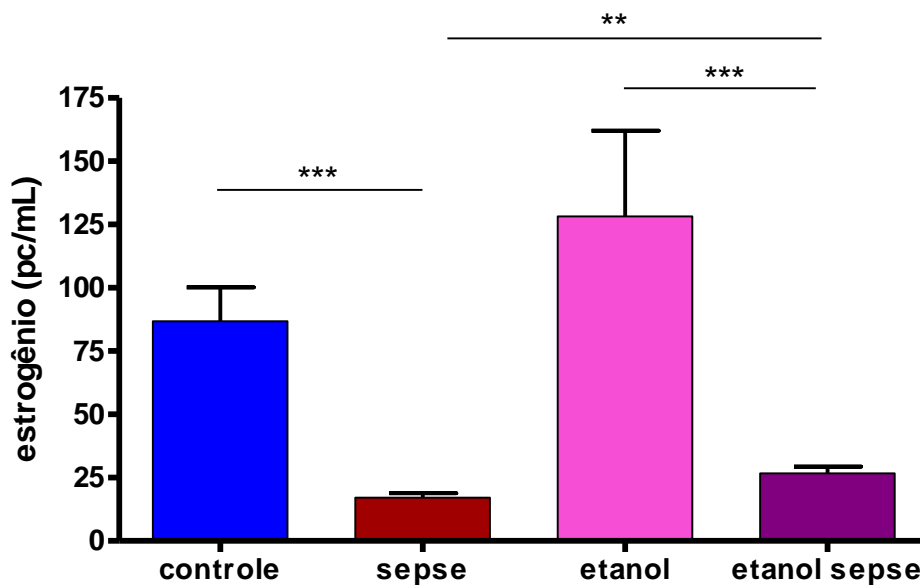
Tabela 5.2.2 Variações correspondentes aos níveis séricos dos parâmetros bioquímicos dosados pelo método de ELISA 8 horas após indução de sepse, utilizando como parâmetro o grupo Controle.

| Bioquímica | Sepse | Etanol | Etanol Sepse |
|-------------------|-------|--------|--------------|
| Creatinina | ↑ | ↑ | ↑ ↑ |
| Uréia | ↓ ↓ | ↓ ↓ | ↓ |
| Proteínas | ↑ | ↓ | ↑ |
| Glicose | ↓ | ↓ | ↓ ↓ |
| Albumina | ↑ | ↓ | ↑ |
| AST | ↑ | ↑ | ↑ ↑ |
| ALT | ↑ | ↓ | ↑ ↑ |

A avaliação dos níveis de estrogênio (gráfico 5.2.6) demonstrou diminuição significativa no grupo Etanol Sepse ($26,7 \pm 10,5$ pc/mL) em relação ao grupo Etanol ($128,2 \pm 101,7$ pc/mL) e aumento em relação ao grupo Sepse ($17,2 \pm 7,1$ pc/mL). A sepse também provocou queda deste hormônio entre os animais que

consumiram água e, embora tenha ocorrido um aumento no grupo Etanol em relação ao Controle ($86,7 \pm 40,3$ pc/ml), esta diferença não foi significativa estatisticamente.

Gráfico 5.2.6: Níveis de 17β - estradiol dosado pelo método de ELISA através de punção cardíaca realizada 8 horas após a indução séptica.



Grupos Controle (n=12) e Sepse (n=20) receberam água e os grupos Etanol (n=12) e Etanol Sepse (n=25) receberam solução de etanol 10% v/v durante quatro semanas. *** Etanol / Etanol Sepse $p < 0,0001$; ** Sepse/ Etanol Sepse $p = 0,0035$; *** Controle/ Sepse $p < 0,0001$, Mann Whitney.

Tabela 5.2.3 Variações correspondentes aos níveis séricos do hormônio 17β -estradiol dosado pelo método de ELISA 8 horas após indução de sepse.

| Grupos | Sepse | Etanol | Etanol Sepse |
|------------|-------|--------|--------------|
| Estrogênio | ↓ ↓ | ↑ ↑ | ↓ |

5.3 EXPERIMENTO 3: QUANTIFICAÇÃO DA CARGA BACTERIANA A PARTIR DE COLETA DO LAVADO PERITONEAL

A comparação do crescimento bacteriano do lavado peritoneal entre os animais (gráfico 5.3.1) teve como parâmetro a diluição 10^{-4} . Nos grupos que não sofreram sepse, não foi observada formação de colônias em nenhuma das diluições do meio de cultura. Entre os animais que sofreram sepse foi observado crescimento bacteriano na diluição 10^{-2} e no meio no qual o lavado não passou por diluição em grande proporção, de forma que não houve possibilidade de realização de cálculo das unidades formadoras de colônias. Na região de diluição 10^{-4} foram calculadas 10000, 52000, 35000 e 35000 UFCs nos animais do grupo sepse. Entre os animais do grupo Etanol Sepse, não houve formação de colônias em duas placas. Nas demais, o crescimento foi equivalente a 21000 e 10000 UFCs. Na região da diluição 10^{-6} , foi observado 4000 UFCs em um animal do grupo Sepse e 52000 UFCs em um animal do grupo Etanol Sepse. Nas demais placas, não houve crescimento bacteriano nesta diluição. Apesar de ter ocorrido diminuição na formação de colônias nos animais que consumiram etanol, esta diferença não foi significativa.

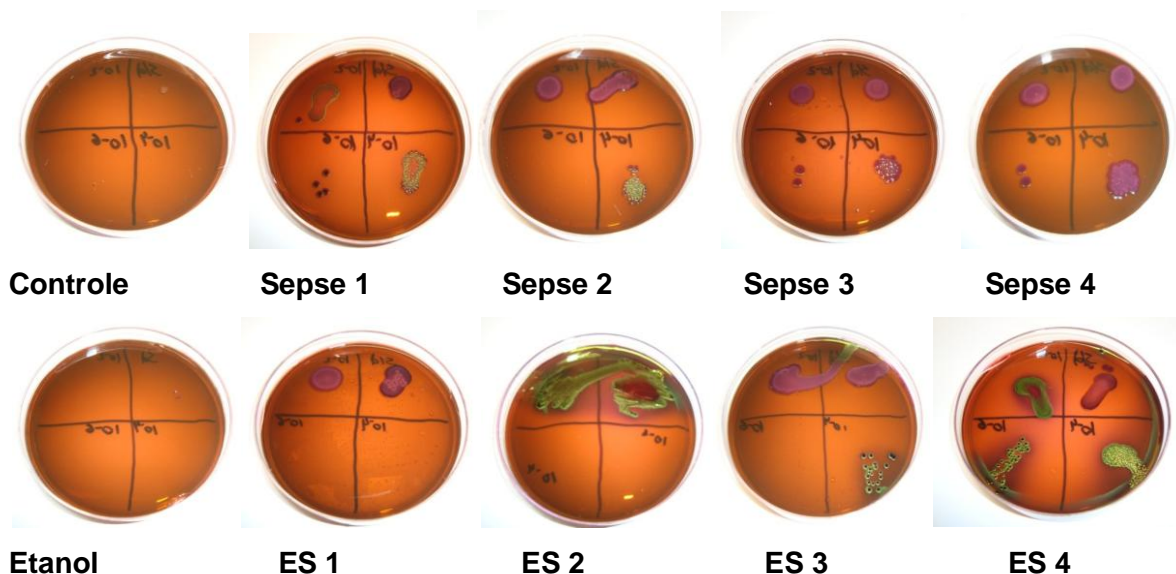
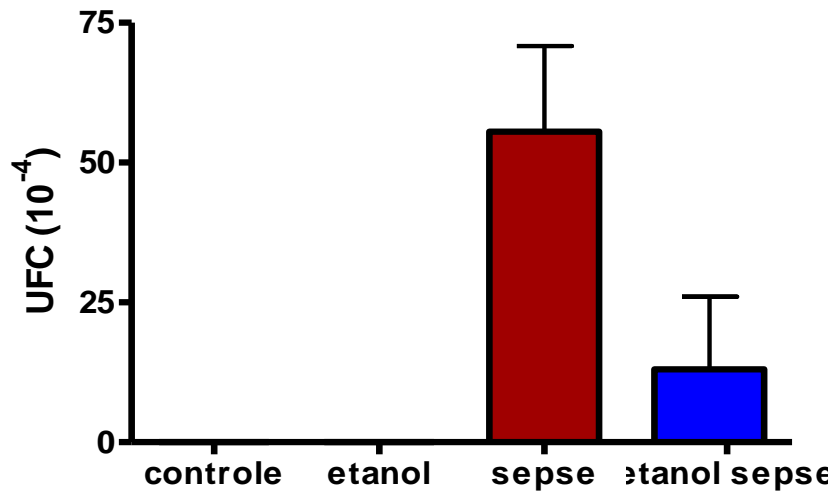


Figura 4.5.2. Resultado da incubação do lavado peritoneal de animais em meio de cultura EMB após 24 horas em estufa a 37°C. Valor UFC na diluição 10^{-4} : Controle=0; Sepse=0,001; Sepse 2=0,00052; Sepse 3=0,00035; Sepse 4=0,0005; Etanol=0; ES1=0; ES 2=0; ES 3=0,00021; ES 4=0,00052

Gráfico 5.3.1: Média das unidades formadoras de colônias na diluição 10^{-4} .



Grupos Controle (n=12) e Sepse (n=20) receberam água e os grupos Etanol (n=12) e Etanol Sepse (n=25) receberam solução de etanol 10% v/v durante quatro semanas. Animais Controle e Etanol: UFCs=0. Grupo Sepse: UFC=33000. Grupo Etanol Sepse UFC=15500.

Tabela 5.2.4 Variações correspondentes à carga bacteriana obtida por coleta do lavado peritoneal

| Grupos | Etanol | Sepse | Etanol Sepse |
|--------|--------|-------|--------------|
| UFC | 0 | ↑ ↑ | ↑ |

6 DISCUSSÃO

Nos experimentos realizados, o consumo subcrônico de etanol (10%v/v) foi equivalente a uma alcoolemia média de $41,5 \pm 17,6$ mg% (noite) e $20,0 \pm 8,3$ mg% (dia), de acordo com dados medidos por cromatografia gasosa de Aguiar *et al* (2008). Esta dose, extrapolando para humanos, corresponde a um quadro clínico de euforia e excitação, além de incoordenação motora discreta e alteração do humor e da personalidade. Podendo, portanto, ser considerada uma baixa dose de etanol.

Este estudo demonstra que o consumo de etanol pode aumentar o tempo de sobrevida após indução séptica. A maior sobrevida está associada ao aumento de estrogênio, aumento nos níveis da citocina pró-inflamatória TNF- α e diminuição nos níveis de IL-6 e MIF. Entretanto, não há associação com diferenças nos níveis das citocinas anti-inflamatórias IL-10, TGF- β and IL-13. As alterações nas funções renal e hepática, demonstradas pelo aumento de creatinina e de AST, e a hipoglicemia como consequência do consumo de etanol na sepse podem ser consideradas indicadores de gravidade, podendo explicar a menor sobrevida em 48 horas em relação a 24 horas.

Em nenhum dos experimentos realizados houve alteração do peso corporal dos animais entre os grupos. Considerando que há possibilidade de ocorrer desnutrição em modelos de alcoolismo, os resultados demonstram que não houve influência desta variável no estudo.

Pacientes sépticos possuem características consistentes com imunossupressão, incluindo perda da hipersensibilidade tardia, diminuição da capacidade de combate à infecções e predisposição a infecções nosocomiais (OBERHOLZER *et al.*, 2001). Uma razão para a falha nas estratégias antiinflamatórias em pacientes com sepse pode ser a alteração nas características da síndrome de acordo com sua evolução. Inicialmente, a sepse pode ser caracterizada pelo aumento no nível de mediadores inflamatórios. Entretanto, conforme a sepse persiste, ocorre uma alteração para um estado de imunossupressão relacionada ao aumento no nível de mediadores antiinflamatórios (LEDERER *et al.*, 1999; OBERHOLZER *et al.*, 2001).

A medida da concentração de mediadores inflamatórios pode ser útil na avaliação do estágio da sepse e na adequação da administração de agentes antiinflamatórios. Alternativamente, agentes antiinflamatórios utilizados durante a fase de imunossupressão podem prejudicar a resposta à sepse (FISHER *et al.*, 1996; OBERHOLZER *et al.*, 2001). Quando os pacientes estão em uma fase de baixa imunidade, estratégias inflamatórias que aumentam a função do sistema imune inato e adaptativo podem ser consideradas eficazes (OBERHOLZER *et al.*, 2001; OPAL *et al.*, 2000). A capacidade do interferon-gama, um potente ativador de macrófagos, de aumentar a sobrevivência em um subgrupo de pacientes sépticos pode ser um exemplo de terapia de aumento da imunidade na sepse (DOCKE *et al.*, 1997). O interferon-gama foi capaz de restaurar a expressão de macrófagos HLA-DR e a produção de TNF- α em pacientes com sepse.

Embora as citocinas pró-inflamatórias sejam consideradas prejudiciais em alguns estudos por causar falência de órgãos ou apoptose de células do sistema imune (HOTCHKISS *et al.*, 2001), elas também possuem efeitos benéficos na sepse. Estudos em modelos animais de peritonite demonstraram que o bloqueio de TNF- α é capaz de diminuir a sobrevivência (ESKANDARI *et al.*, 1992; ECHTENACHER *et al.*, 2001). A imunoterapia combinada contra receptores de TNF- α e interleucina-1 foi fatal em modelo neutropênico de sepse (OPAL *et al.*, 1996). Da mesma forma, em

estudos clínicos já foi observado que a utilização de antagonista de TNF foi capaz de aumentar a mortalidade (FISHER *et al.*, 1996). O papel do TNF- α no combate de infecções foi recentemente ressaltado pela descoberta de que a sepse e outras complicações infecciosas se desenvolveram em pacientes com artrite reumatóide tratados com antagonistas de TNF (KEANE *et al.*, 2001). No presente estudo, o aumento de TNF- α no experimento 2 no grupo Etanol Sepse em comparação ao grupo Sepse ratifica o efeito benéfico do TNF- α no prognóstico da sepse, considerando que os animais em consumo de etanol foram os que apresentaram prolongamento da sobrevivência após indução séptica na análise de mortalidade (experimento 1).

Nossos resultados demonstram que animais sépticos em consumo de etanol apresentaram menores níveis de IL-6 e MIF em comparação a animais sépticos em consumo de água. A diminuição destas citocinas neste grupo de animais (Etanol Sepse) parece estar associada com sua maior sobrevivência, especialmente porque o MIF também contribui para a patogênese da sepse e outras desordens do sistema imune (CALANDRA *et al.*, 2003). O bloqueio da atividade do MIF através de anticorpos monoclonais específicos já foi capaz de proteger ratos da sepse letal induzida por punção e ligação cecal (sobrevivência de 81% em animais tratados com anticorpos e de 31% em animais do grupo controle) (CALANDRA *et al.*, 2000). Apesar de não estar clara a relevância dos efeitos da IL-6 na sepse, essa citocina é a que melhor apresenta correlação com a mortalidade, em modelos experimentais e em pacientes com sepse. Quanto maior os níveis plasmáticos de IL-6, maior a probabilidade de o paciente morrer (REMICK *et al.*, 2002). A IL-6 participa, principalmente, na indução de febre e na produção hepática de proteínas de fase aguda. Em modelo experimental, após punção e ligação cecal, os animais com maior grau de mortalidade apresentaram os maiores níveis de IL-6 (EBONG *et al.*, 1999). Em estudos com ratos, foi identificada a associação entre maiores níveis de IL-6 após queimaduras, sepse, dano-hemorrágico e disfunção cardíaca com menor grau de sobrevivência (YANG *et al.*, 2004). Além disso, o bloqueio da atividade de IL-6 após

dano-hemorrágico foi capaz de conter os efeitos da IL-6 e normalizar a função cardíaca em ratos (YANG *et al.*, 2007).

O aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias em animais sépticos também encontra-se de acordo com a literatura, considerando que a sepse é caracterizada pela exacerbação da produção de citocinas como TNF- α , interleucinas e MIF com o objetivo de combater o foco infeccioso (ULLOA *et al.*, 2005). No nosso estudo a sepse foi capaz de aumentar os níveis de TNF e IL6 tanto no consumo de água quanto no de etanol. No caso do MIF, apesar de ter ocorrido aparente aumento desta citocina como consequência da sepse, também com a ingestão de ambos os líquidos, estas diferenças não foram significativas estatisticamente.

Entre os parâmetros bioquímicos foi observado que o etanol foi capaz de causar hipoglicemia entre os animais que sofreram sepse. A hipoglicemia em decorrência do consumo de álcool já era esperada, considerando que o álcool pode causar hipoglicemia através da inibição da gliconeogênese (FORMAN *et al.*, 1988), redução da síntese de glicose e comprometimento de seu transporte para a região hepática perivenular (VAN HORN & CUNNINGHAM, 1999). Foi observado também, que a sepse diminuiu os níveis de glicose nos grupos de animais em consumo de etanol. A hipoglicemia na sepse pode ter ocorrido como consequência da letargia dos animais, levando ao menor consumo de água e ração, e pode ter sido uma das causas da diminuição do prolongamento da sobrevivência no grupo Etanol Sepse em 48 horas em comparação a 24 horas.

No entanto, na sepse em humanos, a hiperglicemia é uma característica das alterações agudas que ocorrem em resposta à alteração da homeostase por microrganismos invasores. Na fase aguda da resposta ao estresse, a estimulação neuroendócrina resulta em altos níveis circulatórios de glucagon, hormônio do crescimento, catecolaminas e glicocorticóides. Essas alterações hormonais (também conhecidas como resposta contra-reguladora) e um aumento de citocinas

inflamatórias, isto é, IL-1, IL-6 e TNF- α , são importantes fatores que levam à hiperglicemia. O mecanismo fisiopatológico compreende alterações no metabolismo de carboidratos (por exemplo, resistência periférica à insulina, glicogenólise hepática aumentada e gliconeogênese aumentada) que visam ao redirecionamento do fornecimento de energia a órgãos vitais (BRANCO *et al.*, 2007).

Em 2001, Van den Berghe *et al.* descreveram o uso de insulina para tratar hiperglicemia e normalizar o nível de glicemia (80-110 mg/dL) em um grande ensaio randomizado e controlado, o qual foi realizado em uma única unidade de terapia intensiva (UTI) cirúrgica. Esse ensaio, conhecido como o estudo de Leuven, desafiou o conceito de que a hiperglicemia seja uma alteração adaptativa no estresse e que deveria ser tolerada na doença crítica. O controle glicêmico foi associado a uma redução relativa de 42% em mortalidade na UTI (8% de mortalidade no grupo controle e 4,6% no grupo insulina).

O aumento dos níveis de creatinina em decorrência da sepse em animais que consumiram etanol está de acordo com trabalho de Miranda (2010), que utilizou o mesmo modelo de indução séptica de injeção de fezes via intraperitoneal, em camundongos e, no qual houve aumento dos níveis de creatinina e uréia 24 horas após a indução séptica. A mortalidade por sepse pode aumentar quando complicada por dano renal agudo (UCHINO *et al.*, 2005) Dessa forma, a detecção precoce e avaliação precisa desta injúria através da detecção dos marcadores de função renal pode ser considerada relevante entre pacientes sépticos. A associação entre o consumo de álcool e a função renal, entretanto, ainda não é bem esclarecida. Há evidências que o consumo crônico de álcool pode causar dano direto aos rins (HEIDLAND *et al.*, 1985; VAMVAKAS *et al.*, 1998). Nossa hipótese é que o aumento dos níveis de creatinina não tenha sido suficiente de forma a causar o comprometimento da filtração glomerular em 24 horas que poderia ocorrer como consequência do consumo de etanol. No entanto, o aumento de mortalidade no grupo ES em 48 horas poderia ter como explicação, o dano renal causado pelo

aumento dos níveis desse marcador de função renal como consequência do consumo de etanol em animais sépticos.

Da mesma forma que o aumento dos níveis de creatinina, o aumento da transaminase ALT como consequência da sepse em ratas em consumo de etanol encontra-se de acordo com trabalho de Miranda (2010), o qual, no entanto, não avaliou a influência do consumo de álcool. Considerando que o aumento nos níveis de enzimas hepáticas pode aumentar o risco de choque séptico, o qual é muito comum em pacientes alcoolistas, os maiores níveis de AST no grupo ES em comparação ao grupo S, ou seja, em decorrência do consumo de etanol em animais sépticos, encontram-se de acordo com estudos clínicos (AUBE *et al.*, 1992; LEIBOVICI *et al.*, 1997). Entretanto, os maiores níveis destas enzimas após o consumo de etanol e indução séptica possivelmente não foram suficientes para causar dano hepático que poderia aumentar a mortalidade neste grupo de animais.

A exposição crônica ao etanol é capaz de alterar a produção de estrogênio e os efeitos do álcool sobre a imunidade podem envolver um mecanismo indireto no qual o álcool altera os níveis hormonais e, em contrapartida, os hormônios regulam a resposta imune. Nossos resultados demonstram que o consumo voluntário de etanol a 10% v/v durante quatro semanas em animais na fase estro do ciclo estral (na qual os níveis de estrogênio encontram-se mais baixos), é capaz de elevar os níveis de estrogênio após indução séptica.

Diversos estudos demonstram um papel protetor do estrogênio após trauma e sepse (RAJU *et al.*, 2008; ANGELE *et al.*, 2000) Em ratos, a administração de estradiol após dano-hemorragico normalizou a exacerbada liberação de citocinas pró-inflamatórias de células de Kupffer e cardiomiócitos. O tratamento com estrogênio também foi capaz de restaurar a função cardíaca, possivelmente através da diminuição na liberação de IL-6 (YANG *et al.*, 2004). Semelhantemente, a administração de flutamida, fármaco antiandrógeno capaz de impedir a ligação da testosterona a receptores de células alvo, após dano-hemorragico e ressuscitação foi

capaz de normalizar a baixa liberação de citocinas por macrófagos esplênicos e peritoneais (WICHMANN *et al.*, 1997). A habilidade do estrogênio em modificar a liberação de citocinas pôde ser demonstrada também em estudo no qual a produção de TNF- α por macrófagos peritoneais aumentou quando estes foram postos em meio de cultura junto ao estradiol (CHAO *et al.*, 1995).

No experimento 3, a aparente diminuição nas unidades formadoras de colônias observadas após incubação do lavado peritoneal do grupo Etanol Sepse pode ser explicada pelo alto clearance bacteriano que poderia ocorrer neste grupo com o objetivo de combater o foco infeccioso. Essa maior eliminação bacteriana pode também estar associada também ao papel protetor do estrogênio em relação ao aumento da quimiotaxia e modulação da produção de citocinas.

A diminuição nos níveis de estrogênio após a indução de sepse tanto em animais em consumo de água quanto naqueles em consumo de etanol não era esperado, considerando estudos clínicos (SCHRÖDER *et al.*, 1988; FOURRIER *et al.*, 1994) nos quais ocorre aumento de estrogênio após a sepse e outros danos. É possível que a natureza estática da obtenção de uma medida apenas (8 horas após a injeção via i.p.) falhe no processo dinâmico que teria sido aparente se o estrogênio e as citocinas fossem medidos em vários intervalos.

Novos estudos realizando reposição de estrogênio em animais em consumo de etanol seriam úteis para avaliar os níveis deste hormônio que poderiam aumentar a sobrevida na sepse e sua associação com a modulação de citocinas pró-inflamatórias nas diferentes fases da sepse. Da mesma forma, a coleta de sangue em vários pontos do experimento seria também importante para que pudesse ser avaliada a cinética do processo séptico. Este estudo é de particular importância em razão da escassa literatura sobre a mulher e da variação de toxicidade de acordo com o ciclo hormonal.

7 CONCLUSÃO

O modelo de sepse experimental proposto foi realizado com sucesso, de acordo com os resultados encontrados nas análises bioquímicas e de citocinas, as quais demonstraram aumento de creatinina, ALT e citocinas pró-inflamatórias como consequência da sepse. O prolongamento da sobrevivência dos animais que ingeriram etanol sugere que esta droga interfere positivamente no processo séptico em animais do sexo feminino. O maior tempo de sobrevivência no grupo Etanol Sepse pôde ser atribuído ao aumento nos níveis de estrogênio, o qual foi, provavelmente associado ao consumo subcrônico de etanol. O mecanismo desse hormônio de modular a resposta imune parece envolver as alterações nos níveis de citocinas pró-inflamatórias, as quais agiram exercendo efeito benéfico na evolução da sepse, e no número de unidades formadoras de colônias obtidas através de incubação do lavado peritoneal.

A mortalidade por sepse pode aumentar quando complicada por injúria renal aguda. Considerando o aumento de creatinina pelo consumo de etanol na sepse, este trabalho ressalta que o aumento de creatinina em pacientes sépticos deve ser cuidadosamente monitorado em unidades de tratamento intensivo. Esta monitorização deve ser realizada com o objetivo da realização de uma intervenção terapêutica de forma a reduzir a mortalidade decorrente de dano renal.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. & LICHTMAN, A. *Imunologia Celular e Molecular*. Elsevier 5^o edição: 293, 2005.
- ABRAHAM, E.; MATTHAY, M. A.; DINARELLO, C. A. *et al.* A. Consensus conference definitions for sepsis, septic shock, acute lung injury, and acute respiratory distress syndrome: Time for a reevaluation. **Crit Care Med**, 28(1): 232-235, 2000.
- AGUIAR, Aline Silva de. **Toxicidade do consumo crônico de baixas doses de etanol e predisposição ao alcoolismo em animais desnutridos**. Tese (Doutorado em Patologia) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro, 2008.
- AGUIAR, A. S.; BOAVENTURA, G. T.; MALHEIROS, L. R. *et al.* Behavioral toxicity of increasing doses of ethanol in malnourished rats. **Nutri Neuro**, 9 (1/ 2): 113- 119, 2006.
- AGUIAR, A. S.; DA-SILVA, V. A.; BOAVENTURA, G. T. Can calories from ethanol contribute to body weight preservation by malnourished rats? **Braz J Med Biol Res**, 37: 841- 846, 2004.
- ANGELE, M. K; SCHWACHA, M. G; AYALA, A.; CHAUDRY, I. H.. Effect of Gender and Sex Hormones on Immune Responses Following Shock. **Shock**, 4: 81-90, 2000.
- ANGUS, D. C.; LINDE-ZWIRBLE, W. T.; LIDICKER, J. *et al.* Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. **Crit Care Med**, 29: 1303–1313, 2001.
- ANGUS, D. C.; WAX, R. S. Epidemiology of sepsis: an update. **Crit Care Med**, 29: S109 – S116, 2001.
- AUBE, H.; MILAN, C.; BLETTERY, B. Risk factors for septic shock in the management of bacteremia. **Am J Med**, 93: 283-288, 1992.
- AYALA, A.; ERTEL, W.; CHAUDRY, I. H. Trauma-induced suppression of antigen presentation and expression of major histocompatibility class II antigen complex in leukocytes. **Shock**, 5: 79–90, 1996.
- BARROS, F. B. **Efeitos do consumo de álcool sobre a sepse**. Dissertação (mestrado em Patologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro, 2011.
- BENJAMIM, C. F. Atualização sobre mediadores e modelos experimentais de sepse. **Med Intensiva**, 34: 18-26, 2001.
- BIRD, M. D.; KARAVITIS, J.; KOVACS, E. J. Sex differences and estrogen modulation of the cellular immune response after injury. **Cell Immunol**, 252(1-2): 57-67, 2008.
- BRANCO, R. G.; TASKER, R. C.; GARCIA, P. C. R. *et al.* Controle glicêmico e terapia insulínica em sepse e doença crítica. **J Pediatr**, 83 (5): 128-136, 2007.

- BREALEY, D.; KARYAMPUDI, S.; JACQUES, T. S. *et al.* Mitochondrial dysfunction in a long-term rodent model of sepsis and organ failure. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, 286: R491-R497, 2004.
- CALANDRA, T.; ROGER, T. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. **Nat Rev Immunol**, 3:791–800, 2003.
- CALANDRA, T.; ECHTENACHER, B.; ROY, D. L. *et al.* Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor. **Nat Med**, 6: 164–70, 2000.
- CHALFIN, D. M.; HOLBEIN, M. E.; FEIN, A. M.; CARLON, G. C. Cost-effectiveness of monoclonal antibodies to gram-negative endotoxin in the treatment of gram-negative sepsis in ICU patients. **JAMA**, 269: 249–254, 1993.
- CHAMPLIN, A. K.; DORR, L.; GATES, A. H. Determining the state of the estrous cycle in the mouse by the appearance of the vagina. **Biol Reprod**, 8: 491-494, 1973.
- CHAO, T. C.; VANALTEN, P. J.; GREAGER, J. A.; WALTER, R. J. Steroid sex hormones regulate the release of tumor necrosis factor by macrophages. **Cell Immunol**, 160: 43-49, 1995.
- COOK, R. T. Alcohol abuse, alcoholism, and damage to the immune system – a review. **Alcohol Clin Exp Res**, 22: 1927-1942, 1998.
- DÖCKE, W-D.; RANDOW, F.; SYRBE, U. *et al.* Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN- γ treatment. **Nature Med**, 3: 678-681, 1997.
- DOSSOW, V.; SCHILLING, C.; BELLER, S. *et al.* Altered immune parameters in chronic alcoholic patients at the onset of infection and of septic shock. **Alcohol**, 28: 137-149, 2004.
- EBONG, S.J.; CALL, D. R.; BOLGOS, G.; *et al.* Immunopathologic responses to non-lethal sepsis. **Shock**, 12: 118-126, 1999.
- ECHTERNACHER, B.; WEIGL, K.; LEHN, N.; MÄNNEL, D. N. Tumor necrosis factor-dependent adhesions as a major protective mechanism early in septic peritonitis in mice. **Infect Immun**, 69: 3550–3555, 2001.
- EDWARD, G.; MARSHAL, E. J.; COOK, C. C. H. **O tratamento do alcoolismo: um guia para profissionais de saúde**. Porto Alegre: Artes Médicas, 1999.
- ESKANDARI, M. K.; BOLGOS, G.; MILLER, C.; *et al.* Anti-tumor necrosis factor antibody therapy fails to prevent lethality after cecal ligation and puncture or endotoxemia. **J Immunol**, 148(9): 2724-2730, 1992.
- FISHER, C. J. Jr.; AGOSTI, J. M.; OPAL, S. M.; *et al.* Treatment of septic shock with the tumor necrosis factor receptor: Fc fusion protein. **N Engl J Med**, 334: 1697–1702, 1996.
- FISHER, C. J. Jr.; SLOTMAN, G. J.; OPAL, S. M.; *et al.* Initial evaluation of human recombinant interleukin-1 receptor antagonist in the treatment of sepsis syndrome: a randomized, open-label, placebo-controlled multicenter trial. **Crit Care Med**, 22: 12-21, 1994.

- FORMAN, D. T. The effect of ethanol and its metabolites on carbohydrate, protein, and lipid metabolism. **Ann Clin Lab Sci**, 18(3):181-189, 1988.
- FOURRIER, F.; JALLOT, A.; LECLERC, L.; *et al.* Sex steroid hormones in circulatory shock, sepsis syndrome, and septic shock. **Circ Shock**, 43: 171-178, 1994.
- FRANCONI, F.; BRUNELLESCHI, S.; STEARDO, L.; CUOMO, V. Gender differences in drug responses. **Pharmacol Res**, 55: 81-95, 2007.
- FRANK, J. *et al.* Chronic alcoholism causes deleterious conditioning of innate immunity. **Alcohol Alcohol**, 39(5): 386-392, 2004.
- FRINK, M.; PAPE, H. C.; VAN, G. M.; *et al.* Influence of sex and age on MODS and cytokines after multiple injuries. **Shock**, 27: 151–156, 2007.
- GILL, J. The effects of moderate alcohol consumption on female hormone levels and reproductive function. **Alcohol Alcohol**, 35: 417-423, 2000.
- GRANSDEN, W. R.; EYKYN, S. J.; PHILLIPS, I.; ROWE, B. Bacteremia due to *Escherichia coli*: A study of 861 episodes. **Rev Infect Dis**, 12: 1008-1018, 1990.
- GROTZ M. R.; DING, J.; GUO, W.; *et al.* Comparison of plasma cytokine levels in rats subjected to superior mesenteric artery occlusion or hemorrhagic shock. **Shock**, 3: 362–368, 1995.
- HEIDLAND, A.; HORL, W. H.; SCHAEFER, R. M.; *et al.* Role of alcohol in clinical nephrology. **Klin Wochenschr**, 63: 948-958, 1985.
- HOTCHKISS, R. S.; TINSLEY, K. W.; SWANSON, P. E.; *et al.* Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans. **J Immunol**, 166: 6952-6963, 2001.
- HOYERT, D. L.; ARIAS, E.; SMITH, B. L.; MURPHY, S. L.; KOCHANECK, K. D. Deaths: final data for 1999. **Nat Vit Stats Rep**, 49: 1–113, 2001.
- JERRELS, T. R.; SIMTH, W.; ECKARDT, M. J. Murine model of ethanol-induced immunosuppression. **Alcohol Clin Exp Res**, 14: 546-550, 1990.
- KAWAKAMI, M.; MEYER, A. A.; JOHNSON, M. C.; *et al.* D. Chronic ethanol exposure before injury produces greater immune dysfunction after thermal injury in rats. **J Trauma**, 30: 27-31, 1990.
- KEANE, J.; GERSHON, S.; WISE, R. P.; *et al.* Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor (alpha)-neutralizing agent. **N Engl J Med**, 345: 1098-104, 2001.
- KOVACS, J. E.; MESSINGHAM, K. A. N. Influence of alcohol and gender on immune response. **Alcohol Res Health**, 26(4): 257-263, 2002.
- KOVACS, J. E.; FAUNCE, D. E.; MESSINGHAM, K. A. N. Ethanol and burn injury: estrogen modulation of immunity. **Alcohol**, 33: 209-216, 2004.
- LEDERER, J. A.; RODRICK, M. L.; MANNICK, J. A. The effects of injury on the adaptive immune response. **Shock**, 11:153-159, 1999.

- LEIBOVICI, L.; DRUCKER, M.; KONIGSBERGER, H.; *et al.* Septic shock in bacteremic patients: risk factors, features and prognosis. **Scand J Infect Dis**, 29: 71-75, 1997.
- MACIEIRA, M. S.; ALMEIDA, W. G.; SILVA, E. A.; *et al.* Alcohol dependence induced in rats by semivoluntary intermittent intake. **Braz J Med Biol Res**, 30: 1107 – 1111, 1997.
- MESSINGHAM, K. A. N.; FAUNCE, D. E.; KOVACS, E. J. Alcohol, injury, and cellular immunity. **Alcohol**, 28: 137-149, 2002.
- MIRANDA, R. C. **Encefalopatia associada a sepse: disfunção comportamental, metabólica e mitocondrial em modelo de sepse abdominal.** Tese/ Mestrado Fundação do Instituto Oswaldo Cruz, 2010.
- NELSON, S.; KOLLS, J. K. Alcohol, host defence and society. **Nat Rev Immunol**, 2: 205-209, 2002.
- OBERHOLZER, A.; OBERHOLZER, C.; MOLDAWER, L. L. Sepsis syndromes: understanding the role of innate and acquired immunity. **Shock**, 16: 83-96, 2001.
- O'BRIEN, J. M. Jr.; LU, B.; ALI, N. A. *et al.* Alcohol dependence is independently associated with sepsis, septic shock, and hospital mortality among adult intensive care unit patients. **Crit Care Med**, 35: 345 – 350, 2007.
- OGLE, T. F.; KITAY, J. I. Ovarian and adrenal steroids during pregnancy and the oestrous cycle in the rat. **J Endocrinol**, 74: 89-98, 1977.
- OLSEN, N. J.; KOVACS, W. J. Gonadal steroids and immunity. **Endocr Rev**, 17: 369-384, 1996.
- OPAL, S. M.; DePALO, V. A. Anti-inflammatory cytokines. **Chest**, 117(4): 1162-1172, 2000.
- OPAL, S. M.; CROSS, A. S.; JHUNG, J. W., YOUNG, L. D.; PALARDY, J. E.; PAREJO, N. A.; DONSKY, C. Potential hazards of combination immunotherapy in the treatment of experimental septic shock. **J Infect Dis**, 173(6): 1415-1421, 1996.
- PERL, T. M.; Dvorak, L.; HWANG T.; WENZEL, R. P. Long-term survival and function after suspected gram-negative sepsis. **JAMA**, 274: 338–345, 1995.
- PITTET, D.; RANGEL-FRAUSTO, S.; LI, N. *et al.* Systemic inflammatory response syndrome, sepsis, severe sepsis and septic shock: Incidence morbidities and outcome in surgical ICU patients. **Intensive Care Med**, 21: 302-309, 1995.
- PUROHIT, V. Can alcohol promote aromatization of androgens to estrogens? A review. **Alcohol**, 22:123–127, 2000.
- RAJU, R.; BLAND, K. I.; CHAUNDRY, I. H. Estrogen: a novel therapeutic adjunct for the treatment of trauma-hemorrhage-induced immunological alterations. **Mol Med**, 14: 213-221, 2008.

- REMICK, D. G.; BOLGOS, G. R.; SIDDIQUI, J. *et al.* A. Six at six: interleukin-6 measured 6 h after the initiation of sepsis predicts mortality over 3 days. **Shock**, 17: 463–467, 2002.
- RITTIRSCH, D.; HOESEL, L.; WARD, P. The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis. **J Leuk Boil**, 81: 137-143, 2007.
- ROBERTS, A. J. *et al.* Estrous cycle effects on operant responding for ethanol in female rats. **Alcohol Clin Exp Res**, 22 (7): 1564-1569, 1998.
- SCHENKER, S. Medical consequences of alcohol abuse: Is gender a factor? **Alcohol Clin Exp Res**, 21: 179–181, 1997.
- SCHRÖDER, J.; KAHLKE, V.; STAUBACH, K. H. *et al.* Gender differences in human sepsis. **Ann Surg**, 133: 1200-1205, 1998.
- SILVA, E.; PASSOS, R.D.H.; FERRI, M.B.; FIGUEIREDO, L.F.P. Sepsis: from bench 3. to bedside. **Clinics**, 63(1): 110-20. 2008
- SLOTMAN, G. L.; QUINN, J. V. Multivariate regression modeling for the prediction of inflammation, systemic pressure, and end-organ function in severe sepsis. **Shock**, 8: 225-231, 1997.
- SUTER, P. M.; SCHTZ, Y; JÉQUIER, E. The effect of ethanol on fat storage in healthy subjects. **N Engl J Med**, 326: 983-987, 1992.
- UCHINO, S.; BELLOMO, R.; MORIMATSU, H. *et al.* External validation of severity scoring systems for acute renal failure using a multinational database. **Crit Care Med**, 33: 1961–1967, 2005.
- ULLOA, L.; TRACEY, K. J. The “cytokine profile”: a code for sepsis. **Trends Mol Med**, 11: 56–63, 2005.
- VAN DER BERGHE, G.; WOUTERS, P.; WEEKERS, F. *et al.* Intensive insulin therapy in critically ill patients. **N Engl Med**, 345: 1359-1367, 2001.
- VAMVAKAS, S.; TESCHNER, M.; BAHNER, U.; HEIDLAND, A. Alcohol abuse: potential role in electrolyte disturbances and kidney diseases. **Clin Nephrol**, 49: 205-213, 1998.
- WICHMANN, M. W.; ANGELE, M. K.; AYALA, A. *et al.* Flutamide: a novel agent for restoring the depressed cell-mediated immunity following soft-tissue trauma and hemorrhagic shock. **Shock**, 8: 1-7, 1997.
- YANG, S.; ZHENG, R.; HU, S. *et al.* Mechanism of cardiac depression after trauma-hemorrhage: increased cardiomyocyte IL-6 and effect of sex steroids on IL-6 regulation and cardiac function. **Am J Physiol Heart Circ Physio**, 287: H2183–H2191, 2004.
- YANG, S.; HU, S.; CHOUDHRY, M. A. *et al.* Anti-rat soluble IL-6 receptor antibody down-regulates cardiac IL-6 and improves cardiac function following trauma-hemorrhage. **J Mol Cell Cardiol**, 42:620–630, 2007.

ZAKHARI, S. Overview: How is alcohol metabolized by the body. **Alcohol Res Health**, 29: 245-354, 2006.

ZELLWEGER, R.; AYALA, A.; DEMASO, C. M.; CHAUDRY, I. H. Trauma-hemorrhage causes prolonged depression in cellular immunity. **Shock**, 4:149-153, 1995.