

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**EFEITOS DA INTOXICAÇÃO AGUDA COM ETANOL SOBRE
PERITONITE INDUZIDA POR ZIMOSAN OU POR INOCULAÇÃO DE
FEZES EM CAMUNDONGOS**

POTHIRA LACERDA CUNHA

**VILA VELHA
ABRIL / 2014**

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**EFEITOS DA INTOXICAÇÃO AGUDA COM ETANOL SOBRE
PERITONITE INDUZIDA POR ZIMOSAN OU POR INOCULAÇÃO DE
FEZES EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada à
Universidade Vila Velha, como pré-
requisito do Programa de Pós-
graduação em Ciências Farmacêuticas,
para a obtenção do grau de Mestre em
Ciências Farmacêuticas.

POTHIRA LACERDA CUNHA

**VILA VELHA
ABRIL / 2014**

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

C972e Cunha, Pothira Lacerda.

Efeitos da intoxicação aguda com etanol sobre peritonite induzida por zimosan ou por inoculação de fezes em camundongos / Pothira Lacerda Cunha. – 2014.

39 f.: il.

Orientador: Fausto Edmundo Lima Pereira.

Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Vila Velha, 2014.

Inclui bibliografias.

1. Camundongo. 2. Álcool no organismo. 3. Peritonite. 4. Choque séptico. I. Pereira, Fausto Edmundo Lima. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 636.0885

POTHIRA LACERDA CUNHA

**EFEITOS DA INTOXICAÇÃO AGUDA COM ETANOL SOBRE
PERITONITE INDUZIDA POR ZIMOSAN OU POR INOCULAÇÃO DE
FEZES EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada à
Universidade Vila Velha, como pré-
requisito do Programa de Pós-
graduação em Ciências Farmacêuticas,
para a obtenção do grau de Mestre em
Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 30 de Abril 2014,

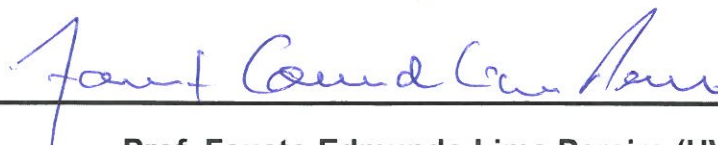
Banca examinadora:



Prof. Tadeu Uggere de Andrade (UVV)



Prof^a Maria Carmen Lopes Ferreira Silva Santos (UFES)



Prof. Fausto Edmundo Lima Pereira (UVV)
(Orientador)

Essa pesquisa foi desenvolvida com auxílio financeiro da Fundação de Amparo a Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES), que concedeu bolsa de estudos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, em primeiro lugar, por me dar forças para alcançar todos meus objetivos de vida e ser a fonte que iluminou essa jornada de sucesso.

Aos meus pais, que me deram todo apoio necessário para o início, desenvolvimento e conclusão desse projeto. Posso dizer que, graças ao incentivo de vocês, hoje me considero uma pessoa realizada.

Ao Prof. Dr. Fausto, exemplo de caráter, honestidade e dedicação, que além de ter me orientado com muita competência no decorrer desses dois anos, contribuiu também para meu crescimento pessoal.

Ao professor Tadeu, por me conceder a oportunidade de tê-lo como sua aluna de Iniciação Científica na graduação de Farmácia e despertou o interesse em mim pela pesquisa e o desejo de realizar o Mestrado.

Ao Prof. Daniel Gomes e à Prof^a Sandra L. V. Von Zeidler, ambos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo (CCS UFES), por me fornecerem acesso aos laboratórios de Imunologia, Patologia Molecular e ao Biotério para execução de boa parte dos experimentos.

Aos que me ajudaram e contribuíram positivamente com carinho, apoio e compreensão em todos os momentos durante a execução deste trabalho.

À Fundação de Amparo a Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES), pela bolsa de estudos e financiamento deste trabalho. A Universidade de Vila Velha – UVV por proporcionar conhecimento e estrutura necessária para realização dessa pesquisa.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

1	INTRODUÇÃO	9
2	OBJETIVOS	15
3	MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1	ANIMAIS EXPERIMENTAIS	16
3.2	INDUÇÃO DA INTOXICAÇÃO ALCOÓLICA AGUDA	16
3.3	INDUÇÃO DE INFLAMAÇÃO NÃO INFECCIOSA	16
3.4	INDUÇÃO DE INFLAMAÇÃO POR AGENTE INFECCIOSO	16
3.5	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	17
3.5.1	Avaliação da exsudação precoce de neutrófilos	17
3.5.2	Avaliação da evolução da peritonite estéril induzida por zimosan	18
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	19
3.7	APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA	19
4	RESULTADOS	20
5	DISCUSSÃO	27
6	CONCLUSÃO	33
7	REFERÊNCIAS	34

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Número de neutrófilos na cavidade peritoneal de camundongos inoculados com zimosan (intraperitoneal) em diferentes tempos após a indução de uma intoxicação etílica aguda (7mg/g de peso corporal, por gavagem; três animais em cada grupo).....20
- Figura 2.** Alguns aspectos do exsudato peritoneal na peritonite induzida pelo zimosan. **A:** Células da cavidade peritoneal de animal controle, sem inoculação do zimosan, mostrando macrófagos residentes e linfócitos; **B e C:** aspecto do exsudato 6 e 12 h após a inoculação do zimosan: predominam neutrófilos com núcleo menos segmentado; **D, E , F G e H:** exsudato 24 h após a inoculação do zimosan: neutrófilos com núcleo com cromatina muito condensada (picnose nuclear, **D**) e neutrófilos com sinais de apoptose (**E e F**, seta); neutrófilos apoptóticos endocitados por macrófagos (**G e H**, setas); os macrófagos tem citoplasma com aspecto espumoso.**I:** Exsudato 48 h após inoculação do zimosan: neutrófilo em apoptose (seta fina) e presença de eosinófilos (cabeças de seta). **J, K:** leucócitos com núcleo em alvo, semelhante aos dos eosinófilos, mas sem os grânulos específicos (setas).....21
- Figura 3.** Intervalo de resolução ($IR = T_{max} - T_{50}$) de peritonite induzida por inoculação de suspensão de zimosan por via intraperitoneal em camundongos controle. Cada ponto representa a avaliação dos neutrófilos no lavado da cavidade peritoneal em um animal do grupo de seis animais que receberam o zimosan no tempo 0.....22
- Figura 4.** Intervalo de resolução ($IR = T_{max} - T_{50}$) da peritonite induzida em camundongos por injeção intraperitoneal de zimosan, uma hora após indução, por gavagem, de intoxicação etílica aguda (grupo etanol; 7mg de etanol/g de peso corporal) ou gavagem de água destilada (grupo controle). O gráfico representa um experimento com avaliação de um animal de cada grupo nos intervalos de tempo indicados.....23
- Figura 5.** Intervalo de resolução da peritonite induzida em camundongos por injeção intraperitoneal de zimosan, uma hora após indução, por gavagem, de intoxicação etílica aguda (grupo etanol; 7mg de etanol/g de peso corporal) ou gavagem de água destilada (grupo controle). Resultados de três experimentos. ($p < 0,05$; teste t de Student pareado).....24
- Figura 6.** Tempo de duração de peritonite induzida pela inoculação intraperitoneal de zimosan em camundongos que receberam por gavagem 7m/kg de peso corporal de etanol (em solução a 40%) ou igual volume de água destilada.....24
- Figura 7.** Curva de mortalidade após inoculação intraperitoneal de suspensão fecal (1:6, 4ul/g de peso corporal) em camundongos que receberam por gavagem 7mg/kg de peso corporal de etanol ou volume semelhante de água destilada.....25

RESUMO

CUNHA, Pothira Lacerda, M.Sc., Universidade de Vila Velha – ES, Abril de 2014.
Efeitos da intoxicação aguda com etanol sobre peritonite induzida por zimosan ou por inoculação de fezes em camundongos. Orientador: Fausto Edmundo Lima Pereira.

Introdução. O etanol diminui a exsudação e capacidade microbicida de neutrófilos durante um episódio de intoxicação aguda. Não se conhece o tempo de duração desses efeitos, nem como uma intoxicação etílica aguda pode interferir na evolução de uma inflamação. **Objetivos.** Avaliar, em camundongos submetidos à intoxicação etílica aguda: (a) a exsudação de neutrófilos na cavidade peritoneal após injeção de zimosan em diferentes tempos após a ingestão do etanol; (b) a evolução de peritonite por injeção intraperitoneal (ip) de zimosan uma hora após a ingestão do etanol, medindo a sua duração e seu intervalo de resolução; e (c) a evolução de uma peritonite polimicrobiana induzida por injeção ip de uma suspensão de fezes homólogas. **Métodos.** Camundongos suíços machos (6/8 semanas de idade) receberam 7mg/g de peso corporal de etanol por gavagem com solução a 40% (grupo etanol) ou gavagem de igual volume de água destilada (grupo controle). Uma, 12, 24, e 48 h depois receberam injeção ip de zimosan (1,5mg). Seis horas depois foram eutanasiados e a cavidade peritoneal lavada para contagem global e diferencial dos leucócitos. Camundongos alcoolizados e controles receberam injeção i.p de zimosan e foram eutanasiados (um controle e um etanol por intervalo de tempo) seis, 12, 18, 24, 48, 96, 120, 144, 168, 192 e 216 h após, para lavagem da cavidade peritoneal e contagem dos neutrófilos, com finalidade de avaliar a duração e o intervalo de resolução da peritonite. Em outro experimento um grupo de camundongos alcoolizados e outro grupo controle receberam uma injeção ip de fezes homólogas diluídas a 1:6 para avaliação da mortalidade. **Resultados** A intoxicação etílica reduziu a exsudação de neutrófilos na inflamação induzida até 12 horas após a ingestão do etanol, retornando a valores normais se a inflamação foi induzida entre 12 e 24 h após a ingestão do etanol. Houve aumento do intervalo de resolução e do tempo de duração da peritonite no grupo etanol. A mortalidade, por choque séptico, após indução da peritonite polimicrobiana foi significativamente maior no grupo etanol. **Conclusões.** Confirma-se que um episódio de etilismo agudo: (a) reduz a exsudação precoce de neutrófilos em uma inflamação estéril e demonstra-se que esse efeito é transitório, com volta progressiva a normalidade se a inflamação é induzida entre 12 e 24 horas; (b) aumenta o intervalo de resolução e o tempo de duração de peritonite produzida por agente não infeccioso; e (c) aumenta a susceptibilidade dos camundongos ao choque endotóxico após injeção intraperitoneal de uma suspensão fecal.

Palavras-chaves: alcoolismo, alcoolismo agudo; inflamação; peritonite; choque séptico.

ABSTRACT

CUNHA, Pothira Lacerda, M.Sc., University of Vila Velha – ES, April of 2014. **Effects of one Episode of alcoholic intoxication on peritonitis induced by zymosan or by fecal inoculation in mice.** Advisor: Fausto Edmundo Lima Pereira.

Introduction. An episode of ethilic intoxication reduces exudation of neutrophil after an acute injury. However there is not information on the effect of a binge on the duration of an acute inflammation .**Objectives.** To evaluate in mice with an acute ethylic intoxication: (a) exudation of neutrophils after intraperitoneal (ip) injection of zymosan in different intervals after ingestion of ethanol; (b) the evolution of a peritonitis after ip injection of zymosan one hour after the binge, measuring its duration and its resolution interval; and (c) the evolution of a polymicrobial peritonitis induced by ip injection of a suspension of homologous feces. **Methods.** Swiss male mice (6/ 8 weeks old) received 7mg/g of ethanol body weight by gavage (ethanol group) or gavage with the same volume of distilled water (control group). One, 12, 24, and 48 h after both groups received an ip injection of zymosan (1.5 mg) .Six hours later mice were euthanized and the peritoneal cavity was washed for global and differential leukocyte counts. Mice with the same treatment received ip injection of zymosan and were euthanized (one control and one ethanol by time interval) six, 12, 18, 24, 48, 96, 120, 144, 168, 192 e 216h after ethanol ingestion, for neutrophils counts to evaluate the duration and resolution interval of peritonitis. Another group received an ip injection of homologous feces diluted 1:6 for evaluation of mortality. **Results** An alcohol binge reduced the exudation of neutrophils in an inflammation induced up to 12 hours after ingestion of ethanol, returning to normal values if the inflammation was induced between 12 and 24 h after ethanol ingestion. There was an increase in the resolution interval and the duration of peritonitis in ethanol group. The mortality from septic shock after induction of polymicrobial peritonitis was significantly greater in the ethanol group. **Conclusions.** Results confirmed that an episode of acute alcoholism :(a) reduces premature exudation of neutrophils in a sterile inflammation and demonstrated that this effect is transitory, with gradual return to normal if inflammation is induced between 12 and 24 hours; (b) increases the resolution interval and duration of peritonitis produced by a non- infectious agent; and (c) increases the susceptibility of mice to septic shock after intra-peritoneal injection of a fecal suspension.

Key words: alcoholism; acute alcoholism; inflammation; peritonitis; septic shock.

1 INTRODUÇÃO

O consumo de bebidas alcoólicas é uma prática frequente e crescente, sendo fator de risco para aumento de mortalidade e morbidade, resultando em aproximadamente 2,5 milhões de mortes a cada ano no mundo. A utilização abusiva, aguda ou crônica, do álcool etílico está associada ao desenvolvimento de várias doenças, incluindo hepatopatias, cardiopatia, pancreatite, neuropatia periférica, neoplasias malignas de cabeça e pescoço, fígado e mama, além de aumentar a susceptibilidade a infecções (WHO, 2004).

Observações em pacientes alcoolistas crônicos têm demonstrado que o uso abusivo do etanol aumenta a susceptibilidade a infecções especialmente infecções bacterianas do aparelho respiratório (SZABO, 1999; ZHANG et al., 2000; HAPPEL et al., 2005; BOÉ et al., 2009; SAMOKHVALOV et al., 2010; BHATTY et al. 2011; MEHTA et al, 2012). Desde o século XIX os médicos se referem ao aumento de incidência e maior gravidade de infecções bacterianas em alcoolistas crônicos (ZHANG et al., 2000), fato confirmado em estudos experimentais em roedores, especialmente camundongos e ratos, submetidos a diferentes modelos de intoxicação alcoólica crônica (JERRELS et al., 1994; BHATTY et al., 2011). Ainda que vários fatores associados ao alcoolismo tais como, hábitos de higiene e alterações no estado nutricional possam aumentar a susceptibilidade a infecções, muitas observações, especialmente as experimentais, têm mostrado que a ingestão do etanol altera as respostas imunitárias inata e adaptativa. Alterações que vão desde a apresentação de antígenos e ativação dos linfócitos T e B e mudanças nos mecanismos efetadores da resposta tem sido observados em humanos e em modelos experimentais (DIAZ et al., 2002; SZABO, MANDREKAR, 2009).

Ainda que a maioria das observações sobre alcoolismo e infecção tenha sido feita em alcoolistas crônicos, há suspeitas que episódios de alcoolismo agudo possam aumentar a susceptibilidade a agentes infecciosos, tanto nos alcoolistas crônicos como nos chamados alcoolistas ocasionais, que ingerem grandes quantidades de bebidas alcoólicas com intervalos de dias, geralmente uma semana. Médicos relatam que é frequente a presença de episódio recente de alcoolismo agudo em pacientes adultos internados com pneumonite bacteriana. Por outro lado,

em modelos experimentais em camundongos é demonstrado que um episódio de intoxicação etílica aguda ou dois ou três episódios subsequentes, tem efeito supressor sobre a resposta imunitária inata, reduzindo a resistência a infecções (PRUETT et al., 2004; PRUETT et al., 2010).

O reconhecimento do agente agressor pelo organismo é o primeiro mecanismo ativado após uma agressão, sendo as alarminas as responsáveis por este efeito (PEREIRA, 2013). Ao serem ativadas, as alarminas (denominadas PAMP se originadas de patógenos ou DAMP se originadas da lesão tecidual) iniciam a resposta imunitária inata, interagindo com receptores denominados genericamente de reconhecimento de padrões moleculares (PRR de *Pattern recognition receptors*), presentes em macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, células epiteliais, fibroblastos e células da glia (MEDZITOV et al., 1997). Estes receptores ao serem estimulados desencadeiam uma série de eventos intracelulares que levam à síntese e/ou liberação de mediadores responsáveis por induzir a resposta imunitária inata, ativando a microcirculação e promovendo saída de leucócitos e plasma para a matriz extracelular. Esta saída de leucócitos e plasma caracteriza uma inflamação, que representa a efetuação da resposta imunitária. Observações em alcoolistas crônicos e em modelos experimentais de alcoolismo em roedores mostram que o etanol pode interferir em todas as etapas da resposta imunitária inata: no reconhecimento pelos receptores PRR, na produção dos mediadores, especialmente citocinas e quimiocinas, na ativação endotelial e na exsudação de leucócitos, especialmente neutrófilos (BROWN et al., 2006).

Redução na sinalização por TLR3 (Toll Like Receptor 3), culminando com a diminuição de produção de citocinas pró-inflamatórias, foi demonstrada em camundongos submetidos a intoxicação etílica aguda (PRUETT et al., 2004). A administração aguda de álcool tem um efeito supressor sobre a liberação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral (TNF alfa), IL-1, IL-6 e CXCL-8 (IL-8) por monócitos ou macrófagos, tanto *in vitro* (CHEN et al., 1993; VERMA et al., 1993; SZABO et al., 1995) quanto *in vivo* (STOLTZ et al., 2000; BOÉ et al., 2001; MANDREKAR et al., 2002; GORAL et al., 2004; PRUETT et al., 2004). Também interfere na ativação endotelial, reduzindo a captura e adesividade de leucócitos (BOÉ et al., 2001; GORAL et al., 2004; SAEED et al., 2004).

A redução de síntese e liberação de citocinas e quimiocinas está relacionada com a diminuição do acúmulo de leucócitos em sítios de infecção ou inflamação após intoxicação com etanol (DIAZ et al., 2002; BROWN et al., 2006; SZABO et al., 2009). Redução da exsudação de neutrófilos no sítio de inflamação tem sido demonstrada em humanos (BRAYTON et al., 1970;) e em modelos experimentais em roedores submetidos a intoxicação etílica aguda (ZHANG et al., 1997; SAEED et al., 2004). Além dos efeitos nos processos de exsudação dos leucócitos, tem sido demonstrado que uma intoxicação alcoólica aguda reduz a atividade fagocitária e microbicida de macrófagos e reduz a migração e capacidade microbicida de neutrófilos (PRUETT et al., 2010; BHATTY et al., 2011).

Os dados da literatura sugerem que a ingestão do etanol tem efeito imunossupressor e anti-inflamatório, sendo esse talvez o mecanismo responsável pelo aumento da susceptibilidade a infecções observadas em alcoolistas crônicos e após um episódio de alcoolismo agudo em modelos experimentais em roedores (PRUETT et al., 2010). Curiosamente, embora se demonstre os efeitos anti-inflamatórios de etanol *in vitro* e *in vivo* reduzindo a produção de citocinas, o consumo crônico de etanol em humanos resulta, com frequência em níveis aumentados de TNF e IL-6 na circulação (KHORUTS et al., 1991; COOK et al., 2004; ZHU et al., 2004).

Ao discutir os resultados dos efeitos da intoxicação alcoólica aguda na resposta imunitária em modelos experimentais, os autores pouco discutem se os efeitos são devidos à ação direta do etanol nas células do sistema imunitário ou se devido a efeitos indiretos do álcool como, por exemplo, ativando o eixo hipotálamo hipófise induzindo liberação de hormônios da adrenal (corticóides) os quais influenciam profundamente a resposta imunitária. De fato, nos modelos de intoxicação etílica em camundongos, foram observados redução significativa dos linfócitos do timo e baço, após um episódio de etilismos agudo (entre 5 e 7mg/g) ou dois episódios subsequentes com intervalo de 24 horas, onde o etanol foi administrado por gavagem em soluções onde a concentração variou de 32 a 40% (HAN et al., 1993; CARSON, PRUETT, 1996). Também se observou redução das células do timo quando o etanol foi administrado em dietas líquidas durante quatro

dias consecutivos (HAN et al., 1993). Nesses modelos de intoxicação etílica aguda por gavagem em dose única a involução do timo se relaciona com a liberação de esteróides da suprarrenal, já que a inibição dos efeitos da corticosterona impede a involução do órgão após a intoxicação etílica aguda. (HAN et al., 1993). É possível que parte dos efeitos imunitários da intoxicação etílica aguda em camundongos possa ser mediada pelo efeito imunossupressor do estresse, de modo semelhante ao que ocorre em outras formas de estresse induzidos por toxicantes químicos (PRUETT et al., 1993; HAN, PRUETT 1995; PRUETT et al., 1994). A resposta imunitária do camundongo é mais susceptível a ação dos corticóides endógenos do que a dos humanos, sendo possível que o aumento da produção de corticóides após episódios de alcoolismo agudo humano seja menor, acarretando efeitos imunitários mais brandos.

É possível que outros mecanismos imunitários possam estar alterados por ação direta do etanol. Entre eles se discute a possível ação do etanol sobre a membrana celular, mais especificamente sobre as jangadas da membrana ou domínios resistentes a ação de detergentes (*lipid rafts*) importantes na localização de receptores e manutenção dos mesmos em associação ou próximos a moléculas importantes na recepção e transdução do sinal. Nesses domínios o etanol alteraria a relação proteína lipídeo, interferindo nas associações moleculares (DOLGANIUC et al., 2006; SZABO et al., 2007).

Um modelo de inflamação aguda experimental não infecciosa, muito utilizado, é a peritonite induzida pela injeção intraperitoneal de zimosan (células mortas de *Sacharomyces cerevisiae*). Nesse modelo, dependendo da dose de zimosan injetado, há um rápido influxo de neutrófilos para a cavidade peritoneal, seguido de exsudação de mononucleares que persiste por um tempo variável: entre 7 e 9 dias após injeção de 1 a 3 mg de zimosan e 15 ou mais dias com doses mais elevadas (10mg de zimosan). Nesse modelo se demonstra que a cura do processo se instala com a progressiva redução do exsudato de neutrófilos, diferenciação dos macrófagos em células espumosas e aumento do exsudato de eosinófilos (CASH et al., 2009; YAMADA et al., 2011). A avaliação sequencial do exsudato inflamatório, com contagem diferencial das células em diferentes intervalos, permite acompanhar a evolução da peritonite.

Peritonite infecciosa pode ser produzida pela injeção intraperitoneal de vários agentes bacterianos isoladamente (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* entre outros) ou pode-se obter uma peritonite polimicrobiana pela inoculação de uma suspensão de fezes, por ligadura e perfuração do ceco ou por produção de estenose parcial do intestino grosso (SHADOMY, PULASKI, 1966). O modelo de peritonite polimicrobiana por injeção de suspensão de fezes é simples e permite acompanhar o choque séptico que se estabelece precocemente após a inoculação das fezes. Além disso, nos animais sobreviventes podemos avaliar quantitativamente os abscessos peritoneais, indicativos da resistência maior ou menor à infecção. A injeção intraperitoneal de doses sub letais da suspensão fecal permite acompanhar bem a evolução da peritonite (BERMUDES et al., 2011). Esse modelo de peritonite fecal se aproxima do que ocorre no homem após perfuração intestinal espontânea ou acidental.

A cura de uma inflamação aguda é um processo ativo que envolve a síntese de mediadores específicos denominados genericamente de mediadores pró-resolução da inflamação. Até o momento são conhecidos vários derivados lipídicos que atuam como mediadores pró-resolução: lipoxinas (derivados do ácido araquidônico), resolvinas E (derivados do ácido eicosapentaenóico), resolvinas D, protectinas e maresinas (derivados do ácido docosahexaenóico) (LEVY et al., 2001; BANNENBERG et al., 2005; SEHAN et al., 2008; BANNENBERG et al., 2010). Além desses derivados lipídicos, citocinas como TGF β (Fator de crescimento transformador beta) e IL-10, frações solúveis de receptores de citocinas pró-inflamatórias também atuam nos processo de resolução da inflamação aguda. É interessante a observação de que o processo natural de resolução que reduz a migração de neutrófilos e desativa macrófagos pró-inflamatórios, aumenta o poder microbicida do exsudato inflamatório, apesar de reduzir drasticamente sua capacidade lesiva para os tecidos (CHIANG et al., 2012).

Em modelos experimentais de inflamação aguda a avaliação da cinética da exsudação de neutrófilos pode dar idéia do início do processo de resolução. Foi demonstrado que os neutrófilos entram em apoptose e durante esse processo induzem a exsudação de monócitos que se diferenciam em macrófagos pró-resolução (denominados macrófagos M2), produtores de citocinas que induzem o

término da inflamação e o reparo dos tecidos lesados durante o processo flogístico. Um grupo de pesquisadores utilizando o modelo da peritonite induzida por zimosan mostrou que o intervalo entre o tempo no qual o número de neutrófilos exsudados é máximo e o tempo no qual esse número se reduz a metade, denominado de intervalo de resolução, corresponde ao tempo no qual os fenômenos pró-resolução estão em franca atividade (BANNENBERG et al., 2005; SEHAN et al., 2008).

As pesquisas experimentais mostrando redução da imunidade inata após intoxicação etílica aguda, de modo geral, relatam resultados de observações nas quais as agressões foram produzidas logo após a administração do etanol (por gavagem ou injeção intraperitoneal). Não há informações sobre o tempo de duração do efeito inibidor dos mecanismos imunitários do etanol introduzido em grandes doses. Também não há observações sobre o comportamento da evolução de uma de uma inflamação aguda induzida após um episódio de intoxicação etílica.

Por hipótese, uma intoxicação etílica retarda o início de uma inflamação aguda, podendo também retardar o processo de cura. Como já referido anteriormente, os processos de cura de uma inflamação aguda representam fenômenos ativos, dependentes da geração de mediadores anti-inflamatórios que fazem parar o processo iniciado por ação dos mediadores pró-inflamatórios. Se o etanol reduz a resposta imunitária inata, retardando o início da inflamação, poderá também influenciar na síntese e liberação dos mediadores pró-resolução, muitos dos quais tem a sua síntese induzida por mediadores pró-inflamatórios (LEVY et al., 2001; BANNENBERG et al., 2005). Para testar essa hipótese planejamos a presente investigação com finalidade de estabelecer, em camundongos: (a) o tempo de duração dos processos de redução da exsudação de neutrófilos em uma inflamação aguda asséptica induzida em diferentes tempos após a exposição aguda ao etanol; e (b) o modo de evolução de uma peritonite aguda asséptica e de uma peritonite polimicrobiana, induzidas precocemente após um episódio de alcoolismo agudo.

2 OBJETIVOS

Os objetivos da presente investigação foram:

- (a) Avaliar o tempo de duração do retardo da exsudação de neutrófilos em uma inflamação aguda asséptica induzida em diferentes tempos após a exposição aguda ao etanol.
- (b) Avaliar a evolução de uma peritonite aguda, estabelecendo o intervalo de resolução dessa inflamação em camundongos que receberam inoculação intraperitoneal de zimosan imediatamente após exposição aguda ao etanol.
- (c) Avaliar a evolução de uma peritonite polimicrobiana, em camundongos, induzida por injeção intraperitoneal de uma suspensão de fezes homólogas imediatamente após exposição aguda ao etanol.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados camundongos suíços, fêmeas, com 6 a 8 semanas de idade, adquiridos no Biotério de Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo (CCS UFES). Os animais foram mantidos em gaiolas climatizadas, em ciclo de claro e escuro de 12 horas e receberam ração comercial e água filtrada, *ad libitum*.

3.2 INDUÇÃO DA INTOXICAÇÃO ALCOÓLICA AGUDA

A intoxicação alcoólica aguda foi induzida pela administração de etanol a 40% (etanol PA em água destilada) por gavagem feita com agulha metálica apropriada. A dose utilizada para cada animal do grupo experimental foi de 7mg de etanol /g por peso corporal. Os animais do grupo controle receberam igual volume de água destilada (volume médio de 0,4 mL nos dois grupos).

3.3 OBTENÇÃO DO ZIMOSAN

Como agente indutor da inflamação foi utilizado zimosan (células mortas de *Sacharomyces cerevisiae*) como agente flogógeno. O zimosan foi obtido a partir de *Sacharomyces cerevisiae* adquirido no comércio (Fermento Fleihmann liofilizado; AB Brasil Ind e Com de Alimentos Ltda, São Paulo, Brasil). Dois gramas do fermento foram diluídos em 100 mL de salina 0,15M e fervidos em banho-maria durante 30 minutos. Em seguida a suspensão foi centrifugada a 500rpm por dois minutos e o sedimento lavado duas vezes com solução de NaCl 0,15M. A concentração foi ajustada para 5mg/ml em solução salina.

3.4 INDUÇÃO DA PERITONITE POLIMICROBIANA

Foi utilizado um modelo de peritonite induzida por inoculação intraperitoneal de uma suspensão de fezes homólogas frescas. Fezes colhidas do ceco e colon ascendente de camundongo eram pesadas e diluídas em salina a 1:6 (peso/volume) e homogeneizadas com auxílio de seringa armada com agulha. Para indução da peritonite cada animal recebeu 4 µL da suspensão fecal por grama de peso corporal, depois da ingestão de etanol (grupo etanol) ou depois da ingestão de água por gavagem (grupo controle). Com essa dose de suspensão fecal os animais

desenvolvem um quadro de choque séptico que permite a sobrevivência acima de 80% (BERMUDES et al., 2011). Após inoculação, os animais eram observados para verificar a evolução do choque séptico através da avaliação do comportamento dos animais (tendência a ficarem agrupados), eriçamento dos pelos iniciando na cabeça e se estendendo ao dorso, queda da temperatura corporal, sentida pela palpação da cauda e presença de diarreia. A mortalidade foi anotada com intervalo de seis horas nas primeiras 24 horas e posteriormente com intervalo de 24 horas até 7 dias após a indução da peritonite. Após esse período de observação os animais foram eutanasiados com dose letal de tiopental por via intramuscular. Os animais eram necropsiados para identificação e quantificação dos abscessos intraperitoneais.

3.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

3.5.1 Avaliação da exsudação precoce de neutrófilos

Para avaliar a exsudação de neutrófilos após indução de uma inflamação estéril, foi feita injeção intraperitoneal de 300 μ L da suspensão de Zimosan (1,5 mg) nos tempos 1, 12, 24 e 48 horas após a alcoolização (7mg/g de peso corporal) ou após a introdução intragástrica de igual volume de água destilada, utilizando a mesma agulha de gavagem usada para ingestão do etanol. Os animais foram eutanasiados seis horas após a inoculação do zimosan, para avaliação quantitativa do exsudato inflamatório, especialmente dos neutrófilos.

A contagem global e diferencial de leucócitos foi realizada no lavado peritoneal. Logo após a eutanásia, a cavidade peritoneal foi lavada com 3 mL de PBS (tampão fosfatosalina) adicionado com EDTA 3 mM, e o lavado foi aspirado para contagem do número total e diferencial das células exsudadas. A contagem global foi realizada com a utilização de câmara de Neubauer após diluição adequada do lavado peritoneal em solução de Turk (solução de violeta de genciana a 0,01% em ácido acético a 2%). Para contagem diferencial foram confeccionados esfregaços em lâminas de vidro, obtidos com citocentrífuga (Cytospin, Shandon, USA) e corados com corante hematológico INSTANT PROV (NEW PROV- Produtos para laboratório Ltda- Paraná) conforme instruções do fabricante. Foram utilizados três animais alcoolizados e três controles para cada tempo após a alcoolização.

3.5.2 Avaliação da evolução da peritonite induzida por zimosan

Para avaliar o impacto da intoxicação etílica aguda na evolução de uma inflamação aguda, não infecciosa, foi induzida peritonite pela injeção de zimosan. O zimosan utilizado foi o mesmo para o estudo da exsudação de neutrófilos, inoculado na dose de 1 mg/ animal, uma hora após a intoxicação etílica aguda (7mg de etanol/g de peso corporal) ou após a gavagem de volume semelhante de água destilada (grupo controle). Para acompanhar a evolução da inflamação os animais foram eutanasiados 6, 12, 18, 24, 48, 96, 120, 144, 168, 192 e 216 horas após a indução da peritonite. Os animais eram sacrificados aos pares (um controle e um alcoolizado) e a lavagem, da cavidade peritoneal, a contagem global e a diferencial das células eram feitas como descrito no tópico anterior. Foram realizados três experimentos, com avaliação de três animais alcoolizados e três controles para cada tempo de avaliação.

O número absoluto de neutrófilos obtido em cada um dos tempos era lançado em um gráfico para se obter a curva temporal de variação do número dessas células. Essa curva foi realizada com os valores obtidos até 48 horas já que na peritonite induzida pelo zimosan os processos de cura são iniciados dentro desse período (BANNENBERG et al., 2005; SEHAN et al., 2008). Foram obtidas três curvas, com um par para cada tempo, em três experimentos diferentes.

O cálculo do índice de resolução foi feito utilizando a curva de distribuição do número de neutrófilos nos intervalos de tempo em que foram avaliados. Segundo Bannenberg et al (2005) e Sehan et al (2008) o índice de resolução (o tempo da instalação dos fenômenos de resolução) ocorre no intervalo entre o tempo em que o número de neutrófilos é máximo e o tempo no qual o número dessas células se reduz a metade. Quanto mais rápida é a queda do número de neutrófilos, mais inclinada é a curva e menor é o intervalo de resolução. Nesse período, os neutrófilos estão entrando em apoptose e produzindo sinais para os macrófagos se diferenciarem em macrófagos pró-resolução (SOEHNLEIN, LINDBOM, 2010; SILVA, 2011).

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores das variáveis quantitativas foram expressos como a média mais ou menos o erro padrão da média (E.P.M). Os dados foram submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA) ou ao teste *t* de Student pareado. A significância da diferença entre as médias observadas na análise de variância foi determinada pelo teste *post-hoc* de *Bonferroni*. O nível de significância foi aceito quando o valor de *p* era menor do que 0,05.

3.7 APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de ética, bioética e bem estar animal (CEUA-UVV-ES) da Universidade Vila Velha (processo 220-2012).

4 RESULTADOS

O efeito da intoxicação etílica aguda sobre a exsudação de neutrófilos na cavidade peritoneal após injeção de zimosan está apresentado na Figura 1. Há uma redução significativa na exsudação de neutrófilos até 12 horas após a intoxicação etílica, que se recupera em 24 horas.

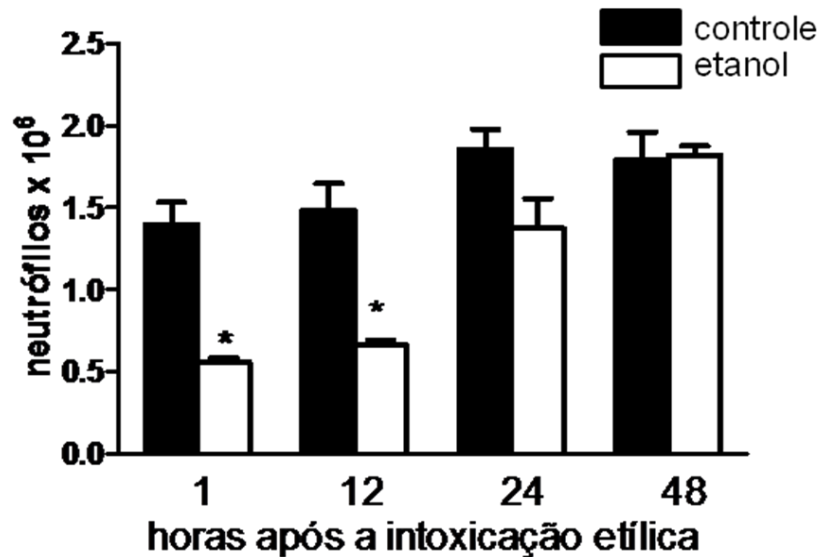


Figura 1. Número de neutrófilos na cavidade peritoneal de camundongos inoculados com zimosan (intraperitoneal) em diferentes tempos após a indução de uma intoxicação etílica aguda (7mg/g de peso corporal, por gavagem; três animais em cada grupo para cada tempo da observação). * $p < 0,05$. (ANOVA one way, com teste de Bonferroni).

A avaliação morfológica do exsudato inflamatório no lavado peritoneal feita em diferentes tempos após a indução da peritonite nos camundongos controle, mostrou que entre 6 e 18 horas as células predominantes no exsudato eram os neutrófilos (entre 60 a 75% das células). Os neutrófilos apresentavam núcleos com menor número de segmentos (Figura 2 B e C), especialmente até 12 horas, tornando-se mais segmentados daí para frente. Com 24 horas o número de neutrófilos ainda era grande, representando em torno de 40 a 50% do exsudato e os macrófagos observados eram maiores, com citoplasma ligeiramente vacuolizado; muitos neutrófilos apresentavam núcleo picnótico (Figura 2D) e alguns apresentavam cariorexe, dados morfológicos indicadores que estavam entrando em apoptose (Figura 2E e F); os macrófagos eram maiores com citoplasma

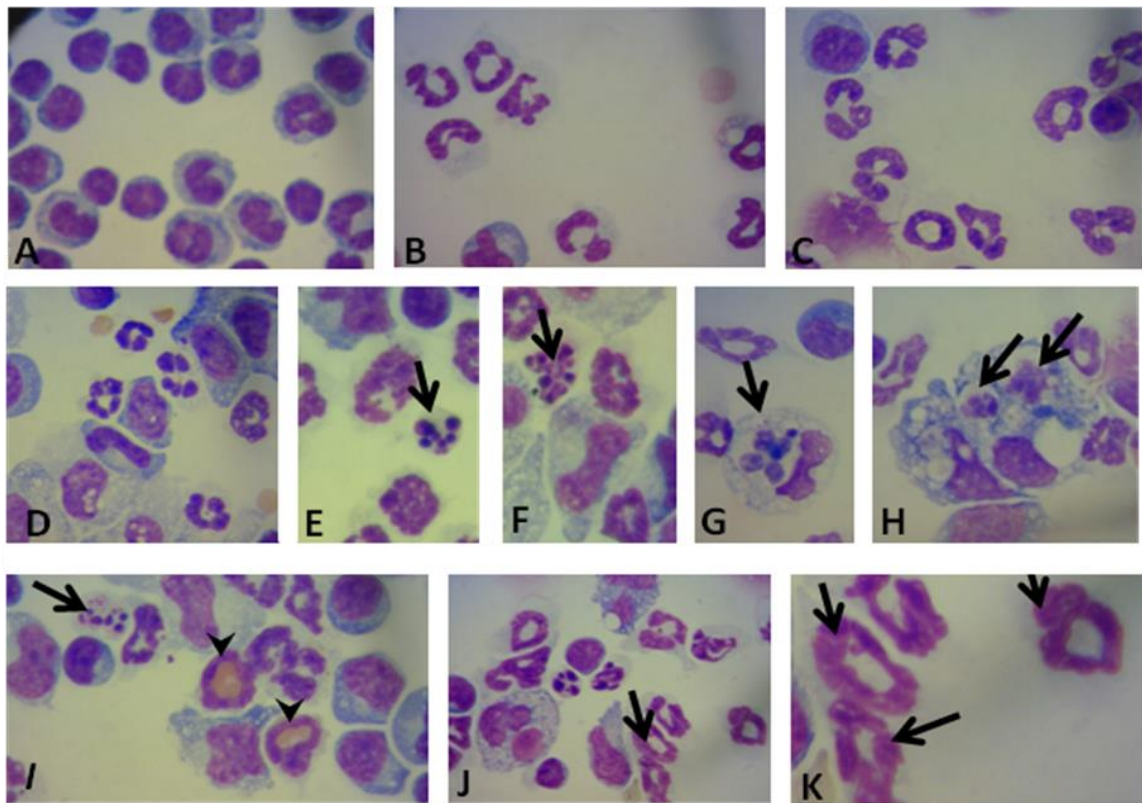


Figura 2. Alguns aspectos do exsudato peritoneal na peritonite induzida pelo zimosan. **A:** Células da cavidade peritoneal de animal controle, sem inoculação do zimosan, mostrando macrófagos residentes e linfócitos; **B e C:** aspecto do exsudato 6 e 12 h, respectivamente, após a inoculação do zimosan: predominam neutrófilos com núcleo menos segmentado; **D, E, F, G e H:** exsudato 24 h após a inoculação do zimosan: neutrófilos com núcleo com cromatina muito condensada (picnose nuclear, **D**) e neutrófilos com sinais de apoptose (**E e F**, setas); neutrófilos apoptóticos endocitados por macrófagos (**G e H**, setas); os macrófagos tem citoplasma com aspecto espumoso. **I:** Exsudato 48 h após inoculação do zimosan: neutrófilo em apoptose (seta) e presença de eosinófilos (cabeças de seta). **J, K:** leucócitos com núcleo em alvo, semelhante aos dos eosinófilos, mas sem os grânulos específicos (setas).

amplo de aspecto espumoso; eram observados macrófagos endocitando neutrófilos em apoptose (Figura 2G e H); alguns eosinófilos eram observados no exsudato após 24 horas, com aumento de seu número até 96 horas (Figura 2 I). Entre 24 e 72 horas o aspecto geral do exsudato era semelhante, com redução do número de neutrófilos, muitos dos quais eram apoptóticos e aumento progressivo de eosinófilos, frequentemente observados no exsudato. O número de linfócitos aumentou

progressivamente e os macrófagos mantinham o aspecto de macrófagos espumosos, observados a partir de 24 horas. Nesse período era crescente o número de leucócitos com núcleo em alvo semelhante aos dos eosinófilos, mas sem os grânulos, que caracterizam essas células (Figura 2J e K). No fim de sete dias o exsudato tinha aparência do observado antes da inoculação do zimosan com macrófagos menores, com citoplasma homogêneo e numerosos linfócitos, de diferentes tamanhos.

A avaliação quantitativa dos neutrófilos nas primeiras 48 horas possibilitou avaliar o intervalo de resolução da inflamação considerado como o intervalo de tempo entre ao pico do número de neutrófilos e o tempo no qual esse número se reduz à metade (Figura 3).

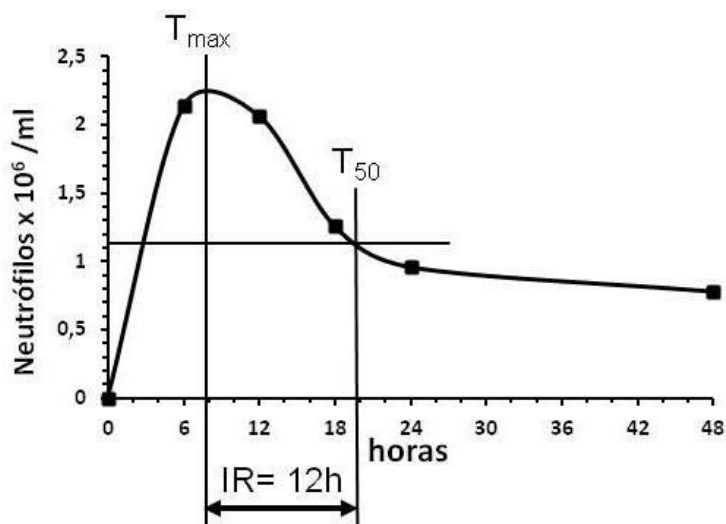


Figura 3. Intervalo de resolução ($IR = T_{max} - T_{50}$) de peritonite induzida por inoculação de suspensão de zimosan por via intraperitoneal em camundongos controle. Cada ponto representa a avaliação dos neutrófilos no lavado da cavidade peritoneal em um animal do grupo de seis animais que receberam o zimosan no tempo 0.

O lavado peritoneal de camundongo controle sem inoculação do zimosan mostrava predomínio absoluto de mononucleares, com macrófagos e muitos linfócitos, sendo raríssimos os neutrófilos (Figura 2A). Os macrófagos eram menores, com citoplasma mais homogêneo.

Nos animais que tiveram a peritonite induzida após a intoxicação etílica aguda o aspecto do exsudato era semelhante, com a diferença relacionada ao maior número de neutrófilos até 24 horas; nesse período e até o final do processo que durou até 9 dias, o aspecto era semelhante: redução progressiva de neutrófilos, neutrófilos em apoptose, endocitose de neutrófilos por macrófagos e aparecimento progressivo de eosinófilos, mais evidente a partir de 48 horas.

Quando acompanhamos a curva da evolução da peritonite avaliada pela contagem de neutrófilos na cavidade peritoneal, há uma diferença evidente nos dois grupos: o exsudato de neutrófilos é menor nas primeiras horas no grupo

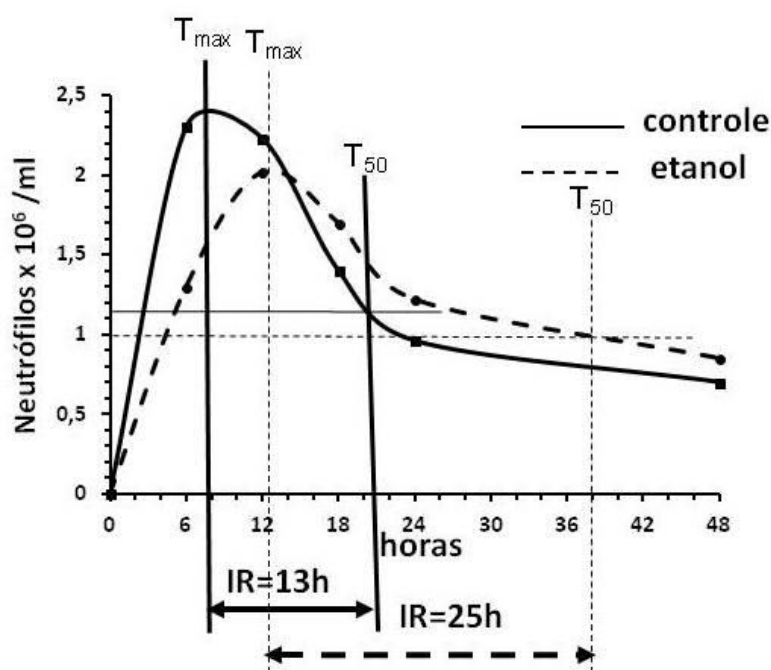


Figura 4. Intervalo de resolução ($IR = T_{max} - T_{50}$) da peritonite induzida em camundongos por injeção intraperitoneal de zimosan, uma hora após indução, por gavagem, de intoxicação etílica aguda (grupo etanol; 7mg de etanol/g de peso corporal) ou gavagem de água destilada (grupo controle). O gráfico representa um experimento com avaliação de um animal de cada grupo em cada intervalo de tempo indicado.

etanol, tendo como consequência um retardo no processo de resolução da inflamação. De fato, o intervalo de resolução da peritonite, (tempo entre o valor máximo de neutrófilos exsudados e a sua redução em 50%), demonstrado na Figura 4, foi significativamente maior nos animais que receberam o etanol do que no grupo controle, observado em três experimentos realizados (Figura 5). Também a duração

total do processo inflamatório foi diferente: no grupo controle a resolução total foi completada no 7º dia após a inoculação do zimosan e no grupo etanol a resolução só se completou em torno do 9º dia (Figura 6).

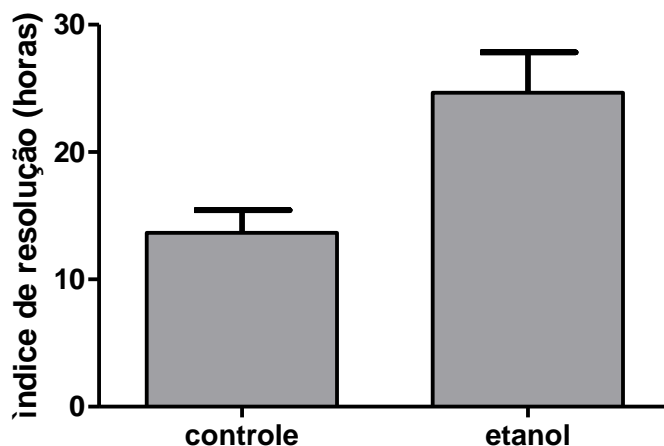


Figura 5. Intervalo de resolução da peritonite induzida em camundongos por injeção intraperitoneal de zimosan, uma hora após indução, por gavagem, de intoxicação etílica aguda (grupo etanol; 7mg de etanol/g de peso corporal) ou gavagem de água destilada (grupo controle). Resultados de três experimentos pareados com um controle e um alcoolizado. (as barras representam as médias \pm o E.P.M; $p < 0,05$; teste t de Student pareado).

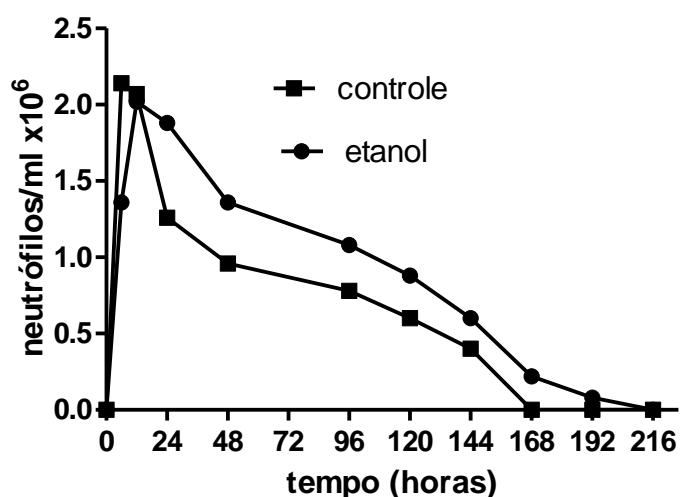


Figura 6. Tempo de duração de peritonite induzida pela inoculação intraperitoneal de zimosan em camundongos que receberam por gavagem 7m/g de peso corporal de etanol (em solução a 40%) ou igual volume de água destilada. Cada ponto representa um animal em cada grupo.

A peritonite induzida pela inoculação intraperitoneal de zimosan produz uma reação sistêmica que pode ser evidenciada pela presença de esplenomegalia a partir de 24 horas, atingindo um pico após 48 horas e se reduzindo até o final do processo. No grupo etanol a esplenomegalia era evidente após 24 horas de modo semelhante à observada no grupo controle, mas os baços permaneceram maiores por mais tempo.

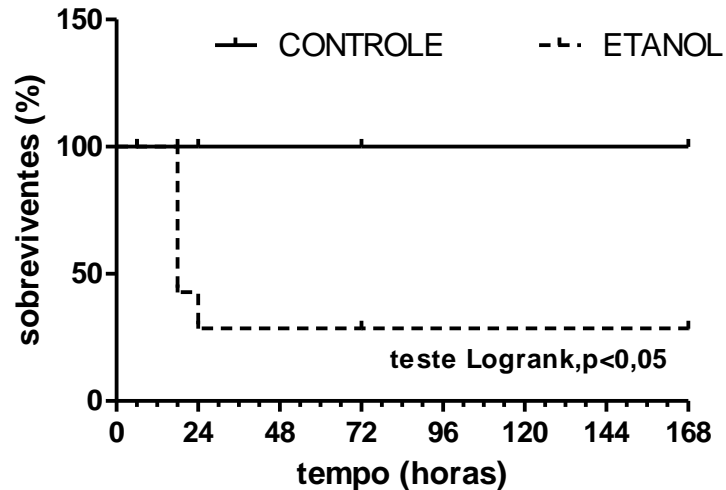


Figura 7. Curva de mortalidade (Kaplan-Meier) após inoculação intraperitoneal de suspensão fecal (1:6, 4ul/g de peso corporal) em camundongos que receberam por gavagem 7mg de etanol/g de peso corporal (grupo etanol; N= 6) ou volume semelhante de água destilada (grupo controle; N= 6).

A intoxicação etílica aguda induziu um aumento significativo da mortalidade nas primeiras 24 horas após a inoculação intraperitoneal de uma suspensão de fezes homólogas. Houve mortalidade de 83% dos animais do grupo etanol nas primeiras 24 horas, decorrente do choque endotóxico (Figura 7). Quando observados nas primeiras doze horas após a indução da peritonite fecal os animais do grupo etanol apresentaram sinais evidentes de choque endotóxico: redução de movimento, tendência a se agrupar, redução da temperatura corporal, demonstrada pela observação direta da temperatura da cauda e arrepiamento dos pelos, iniciando na cabeça e progredindo para todo o dorso; no grupo controle os animais se agrupavam e apresentaram um ligeiro arrepiamento dos pelos na cabeça, no mesmo período. Após 18 horas, 4 de seis animais do grupo etanol foram a óbito, com sinais de diarreia. Apenas um animal sobreviveu após 24 horas, estando recuperado das

manifestações do choque endotóxico 48 horas depois da inoculação intraperitoneal de fezes. Todos os seis animais do grupo controle sobreviveram após 24 horas. Eutanasiados sete dias após a inoculação intraperitoneal de fezes, os animais do grupo controle apresentavam vários abscessos intraperitoneais e alguns hepáticos, apresentando esplenomegalia importante. O único sobrevivente do grupo etanol também apresentava abscessos intraperitoneais e no fígado, de modo semelhante aos do grupo controle e esplenomegalia acentuada.

5 DISCUSSÃO

Os resultados mostraram que nas primeiras 12 horas após uma intoxicação etílica aguda há uma redução significativa da exsudação de neutrófilos no sítio de uma inflamação induzida na cavidade peritoneal de camundongos suíços adultos. Esse resultado confirma observação recente de nosso laboratório, que demonstrou ser menor o exsudato de neutrófilos em camundongos C57BL inoculados por via intraperitoneal com *Staphylococcus aureus* até 24 horas após uma intoxicação etílica aguda induzida com dose de etanol igual a por nós utilizada (HOCAYEN, 2013). Mesmo que nossos resultados tenham mostrado que foi menor a duração da redução do que a observada por Hocayen (2013), os resultados confirmam os dados da literatura que demonstram efeito redutor da intoxicação etílica aguda na exsudação de neutrófilos tanto em humanos (BRAYTON et al., 1970) como em animais de experimentação (ZHANG et al., 1997; SAEED et al., 2004), demonstrando que essa inibição é um fenômeno de curta duração.

A observação da evolução da peritonite induzida pelo zimosan nos camundongos suíços do grupo controle confirmou que nesse modelo de inflamação o processo é limitado, com grande exsudato de neutrófilos nas primeiras doze horas o qual se reduz rapidamente até 24 horas, quando passa a predominar o número de macrófagos e outros mononucleares no exsudato (CASH et al., 2009). Também confirma que na evolução da peritonite, após a exsudação máxima de neutrófilos estes apresentam sinais morfológicos de apoptose, sendo os neutrófilos apoptóticos endocitados pelos macrófagos exsudados. A constatação de neutrófilos em apoptose indica que o processo de resolução está em andamento. De fato, tem sido demonstrado que os neutrófilos sinalizam para a resolução da inflamação, liberando quimiocinas e outras moléculas que reduzem a exsudação de monócitos que se diferenciam em macrófagos inflamatórios (macrófagos M1) e aumentando a exsudação de monócitos que se diferenciam em macrófagos M2 (macrófagos desarmados, macrófagos pró-resolução). São esses macrófagos que produzirão os mediadores pró-resolução: citocinas anti-inflamatórias e mediadores lipídicos especialmente lipoxinas, resolvinas, protectinas e maresinas a partir de ácidos graxos Omega 3 (SOEHNLEIN et al., 2010; SILVA, 2011). Progressivamente os macrófagos tomam aspecto espumoso, característica essa considerada marcadora

de macrófagos pró-resolução (macrófagos desarmados ou macrófagos M2). Outro dado importante de nossos resultados no modelo da peritonite por zimosan foi confirmar o aumento do número de eosinófilos no exsudato a partir de 48 horas; além de eosinófilos típicos eram também observados leucócitos com tamanho de macrófagos, com núcleo lobulado, em forma de alvo, semelhante ao dos eosinófilos, porém sem os grânulos específicos. Yamada e colaboradores (2011) ao demonstrarem a participação dos eosinófilos na resolução de uma inflamação aguda, mostraram que essas células com núcleo em alvo, sem grânulos específicos, apresentavam marcadores típicos de eosinófilos.

Em relação ao efeito da intoxicação etílica na evolução da peritonite pelo zimosan, os resultados mostraram que além da redução da exsudação de neutrófilos nas primeiras horas, houve um aumento do tempo de duração da peritonite, bem evidenciado pelo aumento significativo no intervalo de resolução do processo. Esses resultados mostram, em parte, um efeito anti-inflamatório do etanol, presente nas primeiras horas após a intoxicação aguda, mas que permite a evolução da inflamação para o processo de resolução, aumentando o intervalo de tempo no qual os fenômenos de resolução acontecem.

Os mecanismos pelos quais uma intoxicação aguda com etanol pode interferir na resposta imunitária inata e, em especial, nos seus mecanismos efetadores (a resposta inflamatória) são muito discutidos, mas ainda não esclarecidos. É bem demonstrado que a intoxicação etílica aguda em camundongos induz um estresse que se manifesta por redução acentuada de linfócitos do timo e do baço, por mecanismo relacionado à ativação do eixo hipotálamo hipófise (HAN et al., 1993), fato também por nós observado (dados não mostrados). Portanto é inquestionável que os altos níveis de corticóides que se estabelecem nas primeiras horas após a intoxicação etílica aguda com doses acima 5mg de etanol /g de peso, esteja interferindo na exsudação celular nas primeiras horas após a indução de uma inflamação aguda. De fato, nossos resultados demonstraram que essa exsudação de neutrófilos é reduzida até doze horas após a intoxicação etílica, retornando ao normal até 24 horas. Estudos experimentais têm mostrado que o etanol reduz a transdução de sinais de receptores TLR, a liberação de citocinas pró-inflamatórias e a ativação de células endoteliais, *in vivo* e *in vitro* (CHEN et al., 1993; VERMA et al.,

1993; SZABO et al., 1995; MANDREKAR et al., 2002; STOLTZ et al., 2000; BOÉ et al., 2001; GORAL et al., 2004; PRUETT et al., 2004; SAEED et al., 2004). Nos experimentos *in vivo* é possível que esses efeitos possam estar relacionados a liberação dos corticóides endógenos e nos experimentos *in vitro* os resultados são observados com concentrações de etanol bastante elevadas, às vezes maiores do que as observadas em humanos com intoxicação aguda. De qualquer modo, esses experimentos *in vitro* indicam um efeito direto do etanol sobre células do sistema imunitário. De fato, admite-se que na fase aguda da intoxicação etílica possa haver efeito direto do etanol (ou metabólitos como o acetaldeído) sobre as células do sistema imunitário, mais especificamente sobre as membranas dessas células. Esses autores propõem que o etanol possa se associar a proteínas da membrana, especialmente nas chamadasjangadas ou rafts, que ancoram receptores e moléculas a eles associados (SZABO et al., 2007). É possível que essas alterações possam ser responsáveis por mudanças transitórias na transdução de sinal e na mobilização de receptores e de moléculas da adesão em células endoteliais e em leucócitos, dificultando a adesão celular e a diapedese nas primeiras horas após a intoxicação etílica. Essas modificações seriam transitórias com recuperação funcional das células e normalização rápida do processo exsudativo, o que parece estar demonstrado em nossos experimentos: a exsudação é menor nas primeiras doze horas, mas a partir de 24 horas era até maior no grupo etanol do que no grupo controle.

As alterações induzidas pelo estresse (elevação dos corticóides endógenos) e um possível efeito direto sobre membranas poderiam explicar, pelo menos em parte, a redução da exsudação nas fases iniciais da inflamação aguda induzida em camundongos com intoxicação etílica aguda.

O aumento do intervalo de resolução estaria relacionado ao retardo na exsudação, já que a resolução depende do exsudato inicial de neutrófilos. É possível que a menor exsudação de neutrófilos nas primeiras horas seja acompanhada de menor produção de mediadores lipídicos como prostaglandinas E2 que atuam como pró-inflamatórias nas fases iniciais do processo, mas que são também responsáveis por induzir a síntese de lipooxigenases utilizadas na produção de mediadores lipídicos anti-inflamatórios (LEVY et al., 2001). Por outro lado, Boé e colaboradores

(2010), demonstraram que uma intoxicação etílica aguda em camundongos induz inibição da endocitose de leucócitos apoptóticos por macrófagos em uma inflamação aguda; como a apoptose de neutrófilos e sua endocitose por macrófagos é parte importante no processo de resolução da inflamação aguda (SOEHNLEIN et al., 2010; SILVA, 2011), é possível que essa inibição possa ser também um fator envolvido no alongamento do intervalo de resolução da peritonite observado no grupo intoxicado com etanol.

A intoxicação aguda com o etanol induziu aumento significativo da mortalidade após a indução da peritonite fecal. A mortalidade ocorreu nas primeiras 24 horas, como consequência do choque endotóxico. Esse resultado confirma, em parte, a observação de Pruett e colaboradores (2010) que mostraram aumento de mortalidade em camundongos inoculados com *Escherichia coli* após intoxicação etílica aguda. Esses autores admitiram que nas fases iniciais da infecção (primeiras horas), ainda sob o efeito da alcoolemia, houve inibição da capacidade microbicida da cavidade peritoneal que permitiu maior proliferação bacteriana, o que induziu maior mortalidade. No entanto, não esclarecem se os animais morreram com ou sem manifestações de choque endotóxico, induzido pelas endotoxinas produzidas pela bactéria.

Não é fácil explicar esse aumento de mortalidade no grupo tratado com o etanol, já que no etilismo agudo se demonstra que há redução da atividade de receptores tipo TLR e da síntese de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, o que poderia ter efeito redutor do choque séptico. É possível, como já citado acima, que essas alterações sejam muito transitórias (durante o período da alcoolemia que persiste nas primeiras seis horas) e a persistência, nesse período, de maior quantidade de bactérias viáveis e de endotoxinas absorvidas não retiradas da circulação, pode favorecer uma ação mais intensa quando a alcoolemia se reduz e desaparece; haveria então um aumento de produção de citocinas pró-inflamatórias que acelerariam o quadro do choque.

Outra hipótese seria relacionada ao fato de o etanol inibir apenas uma via de transdução do sinal de receptores TLR, mantendo outras vias intactas, permitindo aos produtos bacterianos ativar esses receptores e produzir citocinas que induzem o

choque. Tem sido demonstrado, que animais nocauteados para MyD88, a proteína de adaptação de TLR que transduz o sinal para ativar a via do receptor que é inibida pelo etanol, quando intoxicados com este álcool e infectados com *E. coli*, se comportam como os animais com o gene íntegro, mantendo altos índices de mortalidade. Este dado mostra que o aumento da susceptibilidade de camundongos com intoxicação etílica aguda a peritonite bacteriana não está relacionada à interferência do etanol nessa via de transdução de sinal do TLR (PRUETT et al., 2010).

Outra possível explicação estaria relacionada ao estresse induzido pela intoxicação etílica aguda, tendo em vista que outro estresse como o produzido pelo jejum agudo, também aumenta a susceptibilidade de camundongos ao choque séptico (FAGGIONI et al., 2000). No entanto o estresse induzido pela intoxicação etílica aguda pode ser diferente do induzido pelo jejum. Neste estresse existe elevação dos níveis de corticóides plasmáticos, com redução drástica de linfócitos do timo e do baço, associada à depressão da resposta imunitária adaptativa. Nessas condições é possível que a imunidade inata fique exaltada, devido a perda da regulação exercida pela imunidade adaptativa (BERMUDES et al., 2011). Essa exacerbação da imunidade inata, na ausência da imunidade adaptativa, foi bem demonstrada pela observação de aumento da susceptibilidade ao choque séptico em camundongos atríquicos e atímicos (“nude mice”, nu/nu) quando inoculados com LPS. A reconstituição desses animais com linfócitos tímicos restaura a resistência ao choque endotóxico (KIM et al., 2007 ; ZHAO et al., 2009). No alcoolismo agudo não temos informação sobre o comportamento da resposta imunitária adaptativa, mas é possível que ela esteja deprimida devido a grande lise de linfócitos por ação dos corticóides endógenos; essa imunodepressão da resposta adaptativa reduziria os efeitos inibidores sobre a imunidade inata, que exacerbada, aumenta a produção de citocinas pró-inflamatórias, após as primeiras horas de ação inibidora direta do etanol, agravando o choque séptico.

No entanto, a tentativa de explicar o aumento da susceptibilidade ao choque séptico no alcoolismo agudo como devida ao estresse, precisa ser melhor investigada, pois o estresse de contenção em camundongos aumenta a resistência ao choque séptico induzido pela injeção de endotoxina (LPS) ou de *Escherichia coli* na cavidade peritoneal, embora interfira pouco na capacidade de eliminar as

bactérias gram negativas (WANG et al., 2008). No estresse de contenção admite-se que corticoides endógenos estejam aumentando a expressão de um fator de transcrição (Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper, GILZ), que inibe a expressão de TLRs, receptores ativados pelo LPS, e importantes na indução de citocinas pró-inflamatórias (WANG et al., 2008). No alcoolismo agudo existe a elevação dos corticóides endógenos e redução da produção de citocinas pró-inflamatórias, por ação sobre receptores TLR, mas isso é acompanhado de aumento da susceptibilidade ao choque séptico e não ao aumento de resistência (PRUETT et al., 2010). Devem existir outros mecanismos desregulados no alcoolismo agudo e no jejum de curta duração que, associados ao estresse, aumentam a susceptibilidade ao choque séptico. No jejum de curta duração existe redução drástica dos níveis de leptina, associada à redução da resposta imunitária adaptativa (FAGGIONI et al., 2000). Portanto, seria interessante investigar se no etilismo agudo essa adipocina possa também estar alterada e se também existe redução da efetuação da resposta adaptativa. Outra investigação importante seria verificar o impacto da intoxicação etílica aguda na produção de eicosanóides anti-inflamatórios (lipoxinas, prostaglandina J2) e de resolvinas E e D, originadas de ácidos graxos ômega 3.

6 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados permitem concluir que uma intoxicação etílica aguda induzida por gavagem em camundongos, reduziu parcialmente a exsudação de neutrófilos em peritonite induzida por inoculação de zimosan até 12 horas após a ingestão do etanol; aumentou o intervalo de resolução e o tempo de duração de peritonite induzida por inoculação de zimosan, uma hora após a ingestão do etanol; e aumentou a mortalidade por choque séptico secundário a peritonite induzida por inoculação de suspensão de fezes uma hora após a ingestão do etanol.

7 REFERÊNCIAS

Bannenberg GL, Chiang N, Ariel A, Arita M, Tjonahen E, Gotlinger KH, Hong S, Serhan CN. Molecular circuits of resolution: formation and actions of resolvins and protectins. *J Immunol.* 2005 ;174:4345-55.

Bannenberg GL. Therapeutic applicability of anti-inflammatory and proresolving polyunsaturated fatty acid-derived lipid mediators. *Scientific World Journal.* 2010;10:676-712.

Bermudes FA, Dettoni JB, Pereira FE. Effects of short term fasting on the evolution of fecal peritonitis in mice. *Acta Cir Bras.* 2011; 26:181-185.

Bhatty M, Pruett SB, Swiatlo E, Nanduri B. Alcohol abuse and *Streptococcus pneumoniae* infections: consideration of virulence factors and impaired immune responses. *Alcohol.* 2011;45:523-539.

Boé DM, Nelson S, Zhang P, Bagby GJ. Acute ethanol intoxication suppresses lung chemokine production following infection with *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis.* 2001;184:1134-1142.

Boé DM, Vandivier RW, Burnham EL, Moss M Alcohol abuse and pulmonary disease. *J Leukoc Biol.* 2009;86:1097-1104.

Boé DM¹, Richens TR, Horstmann SA, Burnham EL, Janssen WJ, Henson PM, Moss M, Vandivier RW. Acute and chronic alcohol exposure impair the phagocytosis of apoptotic cells and enhance the pulmonary inflammatory response. *Alcohol Clin Exp Res.* 2010;34:1723-1732

Brayton RG, Stokes PE, Schwartz MS, Louria DB. Effect of alcohol and various diseases on leukocyte mobilization, phagocytosis and intracellular bacterial killing. *N Engl J Med.* 1970;282:123-128.

Brown LA, Cook RT, Jerrells TR, Kolls JK, Nagy LE, Szabo G, Wands JR, Kovacs EJ. Acute and chronic alcohol abuse modulate immunity. *Alcohol Clin Exp Res.* 2006;30:1624-1631.

Carson EJ, Pruett SB. Development and characterization of a binge drinking model in mice for evaluation of the immunological effects of ethanol. *Alcohol Clin Exp Res.* 1996; 20:132-138.

Cash JL, White GE, Greaves DR. Chapter 17. Zymosan-induced peritonitis as a simple experimental system for the study of inflammation. *Methods Enzymol.* 2009;461: 379-396

Chen GJ, Huang DS, Watzl B, Watson RR. Ethanol modulation of tumor necrosis factor and gamma interferon production by murine splenocytes and macrophages. *Life Sci.* 1993; 52:1319-1326.

Chiang N, Fredman G, Bäckhed F, Oh SF, Vickery T, Schmidt BA, Serhan CN. Infection regulates pro-resolving mediators that lower antibiotic requirements. *Nature.* 2012; 484: 524-528.

Cook RT, Zhu X, Coleman RA, Ballas ZK, Waldschmidt TJ, Ray NB, LaBrecque DR, Cook BL. T-cell activation after chronic ethanol ingestion in mice. *Alcohol.* 2004; 33:175-181.

Díaz LE, Montero A, González-Gross M, Vallejo AI, Romeo J, Marcos A Influence of alcohol consumption on immunological status: a review. *Eur J Clin Nutr.* 2002; 56:50-53.

Dolganiuc A, Bakis G, Kodys K, Mandrekar P, Szabo G Acute ethanol treatment modulates Toll-like receptor-4 association with lipid rafts. *Alcohol Clin Exp Res.* 2006 ;30:76-85.

Faggioni R, Moser A, Feingold KR, Grunfeld C. Reduced leptin levels in starvation increase susceptibility to endotoxic shock. *Am J Pathol.* 2000; 156:1781-1787.

Goral J, Choudhry MA, Kovacs EJ. Acute ethanol exposure inhibits macrophage IL-6 production: role of p38 and ERK1/2 MAPK. *J Leukoc Biol.* 2004; 75:553-559.

Han YC, Lin TL, Pruett SB Thymic atrophy caused by ethanol in a mouse model for binge drinking: involvement of endogenous glucocorticoids. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1993; 123:16-25.

- Han YC, Pruett SB. Mechanisms of ethanol-induced suppression of a primary antibody response in a mouse model for binge drinking. *J Pharmacol Exp Ther.* 1995; 275:950-957.
- Happel KI, Nelson S. Alcohol, immunosuppression, and the lung. *Proc Am Thorac Soc.* 2005; 2:428-432.
- Hocayen JCS. Efeitos da intoxicação aguda com etanol sobre a exsudação de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas, UFES, 2013.
- Jerrells TR, Slukvin I, Sibley D, Fuseler J. Increased susceptibility of experimental animals to infectious organisms as a consequence of ethanol consumption. *Alcohol Alcohol Suppl.* 1994; 2:425-430.
- Khoruts A, Stahnke L, McClain CJ, Logan G, Allen JI. Circulating tumor necrosis factor, interleukin-1 and interleukin-6 concentrations in chronic alcoholic patients. *Hepatology.* 1991; 13:267-276.
- Kim KD, Zhao J, Auh S, Yang X, Du P, Tang H, Fu YX. Adaptive immune cells temper initial innate responses. *Nat Med.* 2007;13:1248-1252.
- Levy BD, Clish CB, Schmidt B, Gronert K, Serhan CN. Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. *Nature Immunol* 2001; 2:612–619.
- Mandrekar P, Bellerose G, Szabo G. Inhibition of NF-kappa B binding correlates with increased nuclear glucocorticoid receptor levels in acute alcohol-treated human monocytes. *Alcohol Clin Exp Res.* 2002; 26:1872-1879.
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature.* 1997; 388:394-397.
- Mehta AJ, Guidot DM. Alcohol abuse, the alveolar macrophage and pneumonia. *Am J Med Sci.* 2012; 343:244-247.
- Pereira, F.E.L. Cap. 4 Inflamação. In: Geraldo Brasileiro Filho, Bogliolo- Patologia Geral 5ª. Ed Guanabara Koogan, Rio de Janeiro 2013.

Pruett SB, Ensley DK, Crittenden PL. The role of chemical-induced stress responses in immunosuppression: a review of quantitative associations and cause-effect relationships between chemical-induced stress responses and immunosuppression. *J Toxicol Environ Health*. 1993; 39:163- 192

Pruett SB, Han YC, Wu WJ. A brief review of immunomodulation caused by acute administration of ethanol: involvement of neuroendocrine pathways. *Alcohol Alcohol Suppl*. 1994; 2:431-437. Review.

Pruett SB, Schwab C, Zheng Q, Fan R. Suppression of innate immunity by acute ethanol administration: a global perspective and a new mechanism beginning with inhibition of signaling through TLR3. *J Immunol*. 2004; 173:2715-2724.

Pruett SB, Fan R, Cheng B, Glover M, Tan W, Deng X. Innate immunity and inflammation in sepsis: mechanisms of suppressed host resistance in mice treated with ethanol in a binge-drinking model. *Toxicol Sci*. 2010; 117:314-324.

Saeed RW, Varma S, Peng T, Tracey KJ, Sherry B, Metz CN. Ethanol blocks leukocyte recruitment and endothelial cell activation in vivo and in vitro. *J Immunol*. 2004; 173:6376-6383.

Samokhvalov AV, Irving HM, Rehm J. Alcohol consumption as a risk factor for pneumonia: a systematic review and meta-analysis. *Epidemiol Infect*. 2010; 138:1789-1795.

Serhan CN, Chiang N, Van Dyke TE. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol*. 2008; 8:349-361.

Shadomy S, Pulaski EJ. Experimental bacterial peritonitis in mice. *J Surg Res*. 1966; 6:107-116

Silva MT. Macrophage phagocytosis of neutrophils at inflammatory/infectious foci: a cooperative mechanism in the control of infection and infectious inflammation. *J Leukoc Biol*. 2011; 89:675-683.

Soehnlein O, Lindbom L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2010; 10:427-439

Stoltz DA, Nelson S, Kolls JK, Zhang P, Bohm RP Jr, Murphey-Corb M, Bagby GJ. In vitro ethanol suppresses alveolar macrophage TNF-alpha during simian immunodeficiency virus infection. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000; 161:135-140.

Szabo G, Mandrekar P, Catalano D. Inhibition of superantigen-induced T cell proliferation and monocyte IL-1 beta, TNF-alpha, and IL-6 production by acute ethanol treatment. *J Leukoc Biol.* 1995; 58:342-350.

Szabo G. Consequences of alcohol consumption on host defence. *Alcohol Alcohol.* 1999; 34:830-841.

Szabo G, Dolganiuc A, Dai Q, Pruett SB TLR4, ethanol, and lipid rafts: a new mechanism of ethanol action with implications for other receptor-mediated effects. *J Immunol.* 2007; 178:1243-1249.

Szabo G, Mandrekar P A recent perspective on alcohol, immunity, and host defense. *Alcohol Clin Exp Res.* 2009; 33:220-232.

Verma BK, Fogarasi M, Szabo G. Down-regulation of tumor necrosis factor alpha activity by acute ethanol treatment in human peripheral blood monocytes. *J Clin Immunol.* 1993; 13:8-22.

Wang Y, Lu Y, Yu D, Wang Y, Chen F, Yang H, Zheng SJ. Enhanced resistance of restraint-stressed mice to sepsis. *J Immunol.* 2008; 181:3441-3448.

World Health Organization. Global status: Report on Alcohol 2004. Department of Mental Health and Substance Abuse. Geneva: WHO, 2004.

Yamada T, Tani Y, Nakanishi H, Taguchi R, Arita M, Arai H. Eosinophils promote resolution of acute peritonitis by producing proresolving mediators in mice. *FASEB J.* 2011; 25:561-568.

Zhang P, Nelson S, Summer WR, Spitzer JA. Acute ethanol intoxication suppresses the pulmonary inflammatory response in rats challenged with intrapulmonary endotoxin. *Alcohol Clin Exp Res.* 1997; 21:773-778.

Zhang P, Bagby GJ, Happel KI, Raasch CE, Nelson S. Alcohol abuse, immunosuppression, and pulmonary infection. *Curr Drug Abuse Rev.* 2000; 1:56-67.

Zhao J, Yang X, Auh SL, Kim KD, Tang H, Fu YX. Do adaptive immune cells suppress or activate innate immunity? *Trends Immunol.* 2009; 30:8-12

Zhu X, Coleman RA, Alber C, Ballas ZK, Waldschmidt TJ, Ray NB, Krieg AM, Cook RT. Chronic ethanol ingestion by mice increases expression of CD80 and CD86 by activated macrophages. *Alcohol.* 2004; 32:91-100.