

INFLUÊNCIA DOS ESTROGÉNIOS NA RESPOSTA HEPÁTICA AO CONSUMO CRÓNICO DE ETANOL E À ABSTINÊNCIA

MARIA JOÃO DOS SANTOS MARQUES

Dissertação de Mestrado em Medicina Legal

2009

MARIA JOÃO DOS SANTOS MARQUES

**INFLUÊNCIA DOS ESTROGÉNIOS NA RESPOSTA HEPÁTICA AO CONSUMO
CRÓNICO DE ETANOL E À ABSTINÊNCIA**

Dissertação de Candidatura ao grau de
Mestre em Medicina Legal submetida ao
Instituto de Ciências Biomédicas de Abel
Salazar da Universidade do Porto.

Orientador – Professora Doutora Maria
Dulce Cordeiro Madeira

Categoria – Professora Catedrática

Afiliação – Faculdade de Medicina da
Universidade do Porto (Instituto de
Anatomia)

Aos meus Pais

AGRADECIMENTOS

É com profundo sentimento de reconhecimento que aqui expresso os meus agradecimentos a todos os que de alguma forma considero terem contribuído indubitavelmente para este trabalho. Peço desculpa àqueles cujo nome, imerecidamente, não seja mencionado.

Ao Professor Doutor Manuel Maria Paula Barbosa, são dirigidas as minhas primeiras palavras, por ter possibilitado a realização desta dissertação no Instituto de Anatomia que tão dignissimamente dirige. Foi crucial a exigência científica a que ficam obrigados todos os que têm o privilégio de integrar a sua equipa. Não posso ainda deixar de salientar a inestimável ajuda prestada na elaboração deste manuscrito.

À Professora Doutora Maria Dulce Cordeiro Madeira, por ter aceite e cumprido exemplarmente a missão de me orientar, pelo apoio científico e crítico, que muito contribuíram para o enriquecimento deste trabalho, e pela estima que me dirigiu.

À Professora Doutora Maria José Carneiro Pinto da Costa pela forma amiga com que sempre me recebeu e pelo apoio e incentivo que, aliados às suas características humanas, me encorajaram a continuar em momentos difíceis.

Ao Professor Doutor José Paulo Andrade, pelos conselhos oportunos que me proporcionou e pela prontidão que, sempre com simpatia, mostrou em auxiliar-me.

À Engenheira Maria Elisa Soares, por me fazer acreditar em mim própria, pela sincera amizade e por me ter adoçado os dias com caramelos.

A todos os Colaboradores do Instituto de Anatomia, em especial à Susana Maria, pelo excelente ambiente humano que proporcionam e que torna aprazível cada dia de labuta.

Aos meus Amigos, pela amizade e incentivo com que sempre me apoiaram e estimularam durante a realização deste trabalho. Agradeço em particular à Marta e à Vera por me terem demonstrado o verdadeiro significado da Amizade e por toda a ajuda que me dispensaram.

Ao Rui, a estrela que iluminou o meu caminho nos momentos de desespero... Pelo carinho e compreensão que me dedicou e que me proporcionaram a força necessária para levar a cabo esta dissertação.

Aos meus Pais, a quem dedico este trabalho, dirijo as minhas últimas mas também mais sentidas palavras. Pelo amor, estímulo e confiança incondicionais. Sem o vosso sorriso nada faria sentido...

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	XI
ÍNDICE DE TABELAS	XIII
RESUMO	XV
RÉSUMÉ	XVII
ABSTRACT	XIX
ABREVIATURAS.....	XXI
INTRODUÇÃO.....	1
OBJECTIVO DO TRABALHO	13
MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
1. PROTOCOLO EXPERIMENTAL	19
2. PARÂMETROS ANALISADOS E METODOLOGIAS	21
2.1. SORO.....	21
2.1.1. Etanol	21
2.1.2. Corticosterona	22
2.1.3. 17- β -Estradiol e progesterona	22
2.2. FÍGADO	23
2.2.1. Peroxidação lipídica	24
2.2.2. Grupos carbonilo	24
2.2.3. Glutationa.....	25
2.2.4. Proteína Bcl-2.....	27
2.2.5. Citocromo c citosólico.....	28
2.2.6. Caspase 3	29

2.2.7. Factor de transcrição NF- κ B	29
3. REAGENTES.....	30
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	31
RESULTADOS	33
1. ANIMAIS E DIETAS	36
1.1. EVOLUÇÃO DO PESO CORPORAL	36
1.2. INGESTÃO DE DIETA SÓLIDA	37
1.3. INGESTÃO DE LÍQUIDOS.....	38
1.4. INGESTÃO CALÓRICA	39
2. PESOS HEPÁTICO E UTERINO.....	40
2.1. FÍGADO.....	40
2.2. ÚTERO.....	40
3. SORO	42
3.1. ALCOOLÉMIA	42
3.2. HORMONAS.....	42
3.2.1. Corticosterona.....	42
3.2.2. 17- β -Estradiol	43
3.2.3. Progesterona	43
4. FÍGADO.....	44
4.1. PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA.....	44
4.2. GRUPOS CARBONILO	45
4.3. GLUTATIONA	46
4.3.1. Glutathione reduzida.....	46
4.3.2. Glutathione oxidada	46
4.3.3. Glutathione reduzida / Glutathione oxidada.....	46
4.4. PROTEÍNA BCL-2	48
4.5. CITOCROMO C CITOSÓLICO	49
4.6. CASPASE 3	50
4.7. FACTOR DE TRANSCRIÇÃO NF-KB	51
4.7.1. Subunidade p50.....	51
4.7.2. Subunidade p65.....	52
DISCUSSÃO	53
1. PARÂMETROS GERAIS	56
2. HORMONAS	58

3. STRESS OXIDATIVO	60
4. APOPTOSE	66
5. INFLAMAÇÃO	72
CONCLUSÕES	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Degradação oxidativa do etanol nos hepatócitos	7
Figura 2. Evolução do peso corporal ao longo do período experimental. Os símbolos representam os valores médios do peso corporal (expressos em g) e as barras verticais o respectivo desvio padrão (n=10 para cada tratamento).....	36
Figura 3. Ingestão de dieta sólida ao longo do período experimental. Os símbolos representam os valores médios da ingestão de dieta sólida (expressos em g) e as barras verticais o respectivo desvio padrão (n=10 para cada tratamento).....	37
Figura 4. Ingestão de líquidos ao longo do período experimental. Os símbolos representam os valores médios da ingestão líquida (expressos em mL) e as barras verticais o respectivo desvio padrão (n=10 para cada tratamento).....	38
Figura 5. Alcoolémia. As colunas representam os valores médios de alcoolémia (expressos em g/L) às 10h e às 22h e as barras verticais representam os respectivos desvios padrão (n=12 para cada hora analisada).....	42
Figura 6. Efeito do tratamento e da administração de estradiol na peroxidação lipídica. As colunas representam os valores médios de equivalentes de MDA e as barras verticais representam os respectivos desvios padrão (n=5 para cada terapia hormonal).....	44
Figura 7. Efeito do tratamento e da administração de estradiol no nível de grupos carbonilo. As colunas representam os valores médios de grupos carbonilo e as barras verticais representam os respectivos desvios padrão (n=5 para cada terapia hormonal).....	45

- Figura 8.** Efeito do tratamento e da administração de estradiol na concentração de proteína Bcl-2. As colunas representam os valores médios relativos à expressão da proteína Bcl-2 e as barras verticais representam os respectivos desvios padrão (n=5 para cada terapia hormonal)..... 48
- Figura 9.** Efeito do tratamento e da administração de estradiol na concentração citosólica de cyt c. As colunas representam os valores médios de cyt c presente no citosol e as barras verticais representam os respectivos desvios padrão (n=5 para cada terapia hormonal) 49
- Figura 10.** Efeito do tratamento e da administração de estradiol na actividade da caspase 3. As colunas representam os valores médios da caspase 3 e as barras verticais representam os respectivos desvios padrão (n=5 para cada terapia hormonal) 50
- Figura 11.** Efeito do tratamento e da administração de estradiol na translocação nuclear da subunidade p50 do NF- κ B. As colunas representam os valores médios relativos à translocação da subunidade p50 e as barras verticais representam os respectivos desvios padrão (n=5 para cada terapia hormonal)..... 51
- Figura 12.** Efeito do tratamento e da administração de estradiol na translocação nuclear da subunidade p65 do NF- κ B. As colunas representam os valores médios relativos à translocação da subunidade p65 e as barras verticais representam os respectivos desvios padrão (n=5 para cada terapia hormonal)..... 52

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Ingestão calórica ao longo do período experimental. Os valores encontram-se expressos em Kcal/mês/animal e estão apresentados sob a forma de média $\pm$ desvio padrão (n=10 para cada tratamento).....	39
Tabela 2. Efeito do tratamento e da administração de estradiol no peso relativo do fígado e no peso uterino. Os valores encontram-se apresentados sob a forma de média $\pm$ desvio padrão (n=5 para cada terapia hormonal).....	41
Tabela 3. Efeito do tratamento e da administração de estradiol nos níveis séricos de corticosterona, estradiol e progesterona. Os valores encontram-se apresentados sob a forma de média $\pm$ desvio padrão (n=5 para cada terapia hormonal).....	43
Tabela 4. Efeito do tratamento e da administração de estradiol nos níveis de glutathione. Os valores encontram-se apresentados sob a forma de média $\pm$ desvio padrão (n=5 para cada terapia hormonal)	47

Resumo

O consumo prolongado de etanol é considerado como sendo um dos factores com maior capacidade para provocar efeitos tóxicos em vários órgãos, particularmente no fígado, uma vez que este é o órgão que se encontra exposto a níveis mais elevados deste xenobiótico. De facto, o etanol é metabolizado neste órgão e o acetaldeído, o principal composto resultante do seu processamento oxidativo, permanece no tecido hepático sendo excretada apenas uma quantidade muito reduzida para a circulação sanguínea. Pelo que o fígado pode ser encarado um órgão chave quando consideramos a toxicidade do etanol. Embora muitos mecanismos tenham sido propostos na tentativa de explicar a toxicidade hepática mediada pelo etanol, diferentes resultados têm vindo a ser relatados devido à utilização de diversos modelos experimentais.

Sabe-se ainda que os danos induzidos pelo etanol são consideravelmente distintos quando se analisam os seus efeitos nos sexos feminino ou masculino, sendo o etanol claramente mais pernicioso no sexo feminino mesmo quando ingerido em menor quantidade. Existem várias possíveis explicações para este facto tais como diferenças no peso corporal, no teor de água e diferenças na absorção, biodisponibilidade e metabolização do etanol. Contudo, o que mais parece influenciar a aumentada toxicidade do etanol verificada no género feminino são as marcadas diferenças hormonais existentes entre os dois sexos.

Com o propósito de avaliar a influência dos estrogénios no estabelecimento das lesões hepáticas induzidas pelo etanol foram utilizados ratos fêmea da estirpe Wistar submetidos a alcoolização crónica e abstinência alcoólica, bem como a condições controlo. Foram colhidas amostras de sangue, para avaliação da alcoolémia e doseamentos hormonais. Procedeu-se igualmente à colheita de tecido hepático para

análise de parâmetros bioquímicos relacionados com o stress oxidativo, apoptose e inflamação.

Verificou-se que o tratamento com etanol induziu marcadas alterações bioquímicas relacionadas com o stress oxidativo, nomeadamente aumento da peroxidação lipídica e alteração do nível de glutatona. Observou-se ainda recompartimentalização do citocromo c e aumento da actividade da caspase 3, o que aponta para a ocorrência de morte celular programada. Em concordância com estes resultados, presenciou-se ainda um aumento da translocação nuclear do factor de transcrição *nuclear factor kappa-B*, nomeadamente das subunidades p50 e p65, indicativo de inflamação hepática agravada nos animais submetidos a alcoolização crónica e abstinência alcoólica. Salienta-se que os resultados observados nos animais alcoolizados se devem exclusivamente à acção nefasta do etanol, dado que não se observaram resultados idênticos nas fêmeas do grupo de controlo nutricional. Foi ainda possível verificar que a abstinência alcoólica induziu, regra geral, uma melhoria dos efeitos fomentados pelo consumo prolongado de etanol. Realça-se também que os resultados apresentados são maioritariamente dependentes dos níveis de estrogénio tendo-se verificado, em quase todos os parâmetros analisados, um agravamento das lesões na presença de estradiol.

Os resultados obtidos claramente demonstram a acção tóxica do etanol a nível hepático em ratos fêmea submetidos a alcoolização crónica e a abstinência alcoólica. Verificou-se ainda existir correlação entre as lesões hepáticas induzidas pelo etanol e o nível de estradiol, facto este que poderá estar associado ao aumento da toxicidade deste xenobiótico no sexo feminino.

RÉSUMÉ

La consommation d'éthanol est une cause majeure de graves dommages dans nombreux organes, en particulier le foie. La vulnérabilité particulière du foie à l'éthanol a été attribuée au fait qu'il est exposé à des concentrations plus élevées d'éthanol que tout autre organe, et à sa capacité de produire des métabolites toxiques potentiellement nocifs à cause de l'éthanol, à savoir l'acétaldéhyde. Ce composé reste dans le tissu hépatique en concentrations élevées et seule une petite quantité de ce métabolite est éliminée dans le flux sanguin. Les mécanismes sous-jacents de la toxicité hépatique de l'éthanol ont été soigneusement étudiés, mais ils ne sont pas encore bien compris. En outre, les données disponibles dans la littérature sont souvent en contradiction, ce qui est probablement dû aux différents modèles expérimentaux utilisés.

En dépit de ces faits, des preuves croissantes ont vu le jour en indiquant que le sexe joue un rôle majeur dans la détermination des effets toxiques de l'éthanol. Comparativement aux hommes, les femmes développent des lésions hépatiques induites par l'éthanol plus rapidement, même quand elles consomment de plus petites quantités d'éthanol. La base de la sensibilité accrue des femmes à l'éthanol est incertaine. Cependant, plusieurs facteurs ont été signalés comme étant les causes possibles des effets spécifiques de l'éthanol, particulièrement l'existence de différences liées au sexe dans le poids corporel, la teneur en eau, et le taux d'absorption, de la disposition et le métabolisme de l'éthanol. Chez les femmes, ces paramètres varient au cours du cycle ovarien et par conséquent il y a des raisons pour supposer que les œstrogènes contribuent à la vulnérabilité accrue du foie à l'éthanol en comparaison avec l'homme.

Dans le but d'évaluer l'influence des œstrogènes dans la création de toxicité hépatique induite par l'éthanol, des rats femelles Wistar ont été soumis à la consommation d'alcool à long terme et à un arrêt ultérieur, ainsi qu'à des conditions

témoins. Des échantillons de sang ont été prélevés afin de mesurer la concentration de l'éthanol et hormonale dans le sérum. Du tissu hépatique a également été prélevé et traité pour estimer le stress oxydatif, l'apoptose et l'inflammation.

Le traitement avec l'éthanol a causé des altérations biochimiques évidentes, compatibles avec les dommages oxydatifs, à savoir l'augmentation de la peroxydation des lipides et des variations des niveaux de glutathion. Cytochrome c relocalisation et augmentation de l'activité caspase 3 a également été observée, ce qui indique que l'éthanol aggrave la survenue de l'apoptose. Une augmentation de la translocation nucléaire du facteur nucléaire kappa B a aussi été observée, en particulier de ses sous-unités p50 et p65, suggérant une inflammation hépatique aggravée chez les femelles exposées à une consommation chronique d'éthanol et à l'arrêt. Il convient de souligner que les altérations trouvées chez les rats soumis à la consommation d'alcool sont susceptibles de résulter de la toxicité induite par l'éthanol et non du fait des déficits nutritionnels liés à la consommation d'alcool à long terme, car aucun des changements similaires ont été détectés dans les rats contrôle nutritionnels. Le retrait de l'éthanol induit, dans la plupart des cas, une amélioration des dommages induits par la consommation d'éthanol chronique. Il est également intéressant de noter que les résultats semblent être dépendants de l'œstrogène sachant que les plus graves changements causés par l'éthanol ont été constatés chez les rats traités avec l'estradiol.

Les résultats du présent étude montrent que l'éthanol exerce des actions nocives dans les tissus hépatiques de rats femelles soumises à une consommation chronique d'éthanol et que seuls certains de ces effets sont réversibles par un retrait de l'éthanol. Ils montrent également qu'il existe une corrélation positive entre les lésions hépatiques induites par l'éthanol et les niveaux d'œstrogènes, ce qui contribue certainement à comprendre la vulnérabilité accrue du foie féminin à l'éthanol.

ABSTRACT

Ethanol consumption is a major cause of severe damage in numerous organs, particularly the liver. The particular vulnerability of the liver to ethanol has been ascribed to the fact that it is exposed to higher concentrations of ethanol than any other organ, and to its ability of producing potentially harmful toxic metabolites of ethanol, namely acetaldehyde. This compound remains in the hepatic tissue in high concentrations and only a small amount of this metabolite is excreted to the blood stream. The mechanisms underlying the hepatic toxicity of ethanol have been thoroughly studied, but they are still not well understood. Moreover, data available in the literature are frequently inconsistent probably due to the different experimental models used.

Despite these facts, increasing evidence has emerged indicating that gender plays a major role in determining the toxic effects of ethanol. When compared to men, women develop ethanol-induced liver damage more rapidly, even when they consume smaller amounts of ethanol. The basis for the increased sensitivity of females to ethanol is uncertain. However, several factors have been pointed out as possible causes for the gender-related effects of ethanol, namely the existence of sex-related differences in body weight, water content, and in the absorption rate, disposition and metabolism of ethanol. In women, these parameters vary over the ovarian cycle and, therefore, there are reasons to assume that estrogens contribute for the enhanced vulnerability of the female liver to ethanol.

With the purpose of evaluating the influence of estrogens in the establishment of the ethanol-induced hepatic toxicity, female Wistar rats were submitted to long-term ethanol consumption and to subsequent withdrawal, as well as to control conditions. Blood samples were collected to measure serum ethanol and hormonal concentration.

Liver tissue was also collected and processed to estimate oxidative stress, apoptosis and inflammation.

Ethanol treatment caused marked biochemical alterations compatible with oxidative damage, namely increased lipid peroxidation and glutathione levels variations. Cytochrome c re compartmentalization and increased caspase 3 activity was also observed, which indicates that ethanol exacerbates the occurrence of apoptosis. In line with these results, it also was noticed an increase in the nuclear translocation of nuclear factor *kappa*-B, particularly of its subunits p50 and p65, suggesting aggravated hepatic inflammation in females exposed to chronic ethanol consumption and withdrawal. It should be emphasized that the alterations found in the rats submitted to ethanol consumption are likely to result from the toxicity induced by ethanol and not from the nutritional deficits associated with long-term ethanol consumption because no similar changes were detected in pair-fed control rats. Withdrawal from ethanol did promote, in most cases, an amelioration of the damages induced by chronic ethanol consumption. It is also worth noting that the results seem to be estrogen-dependent as the most severe ethanol-induced changes were noticed in rats treated with estradiol.

The results of the present study demonstrate that ethanol exerts deleterious actions in hepatic tissue of female rats submitted to chronic ethanol consumption and that only some of these effects are reversible by ethanol withdrawal. They also show that there is a positive correlation between the hepatic damage induced by ethanol and estrogens levels, which certainly contributes to understand the enhanced vulnerability of the female liver to ethanol.

ABREVIATURAS

ADH	Desidrogenase alcoólica
ALDH	Desidrogenase aldeídica
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
Bcl-2	B-cell lymphoma-2
BSA	Albumina bovina sérica
CAT	Catalase
CYP	Citocromo P450
CYP2E1	Citocromo P450 isoforma 2E1
Cyt c	Citocromo c
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNPH	2,4-dinitrofenilidrazina
DTNB	Ácido 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzóico)
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGTA	Ácido etilenoglicol-bis(β -aminoetiléter) N,N,N',N'-tetracético
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EMSA	Electrophoretic mobility shift assay
GR	Glutathione redutase
GSH	Glutathione reduzida
GSSG	Glutathione oxidada
HEPES	Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico
HRP	Peroxidase de rábano

HSD	Honest significant difference
MDA	Malonildialdeído
MEOS	Sistema de oxidação microsomal do etanol
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido (forma oxidada)
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido (forma reduzida)
NF-κB	Nuclear factor <i>kappa</i> -B
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonilo
ppm	Partes por milhão
ROS	Espécies reactivas de oxigénio
rpm	Rotações por minuto
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reactivas com o ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
TNB	Ácido 5-tio-2-nitrobenzóico
TNF-α	Factor de necrose tumoral α

Para algumas abreviaturas foi mantida a nomenclatura anglo-saxónica dado o seu carácter universal, facilitando o seu reconhecimento.

INTRODUÇÃO

O consumo de substâncias psicoactivas está na base de várias patologias em quase todas as regiões do mundo. O etanol é a substância psicoactiva mais utilizada na sociedade (Mukherjee *et al.*, 2007) e os seus efeitos encontram-se descritos desde tempos ancestrais. Embora tenha sido demonstrado que o consumo moderado de soluções contendo etanol tem efeitos benéficos, por exemplo a nível cardiovascular (Room, 2006), o seu consumo excessivo aumenta o risco de dependência e de lesão de vários órgãos (Li, 2008). Com efeito, sabe-se que o etanol está relacionado causalmente com mais de 60 efeitos sobre a saúde, sendo apontado como responsável por um número elevado de mortes (Room, 2006). Actualmente, o problema do alcoolismo transformou-se num dos fenómenos sociais mais generalizados, sendo um grave problema de saúde pública à escala mundial (Chen & Yin, 2008). Como factor de risco associado a diferentes patologias o etanol ocupa, a nível global, o 3º lugar nos países desenvolvidos e o 1º nos países em vias de desenvolvimento (Li, 2008). Aproximadamente 2 biliões de pessoas no mundo consomem etanol, estimando-se que 76 milhões dessas sofrem de patologias decorrentes da ingestão de etanol. De acordo com o *World Health Report*, o consumo crónico de etanol contribui, por si só, com 4% para o peso global de doença (Cunha, 2005; Room, 2006).

Na Europa o consumo de etanol atinge níveis tradicionalmente mais elevados que em outros continentes, o que acarreta um maior número de consequências sociais e de saúde do que noutras regiões (Cunha, 2005). Existem diferenças significativas na ingestão de etanol entre os diversos países europeus e em Portugal o nível de consumo de etanol puro é, segundo o Plano Nacional de Saúde 2004-2010, de 16,59 L por pessoa e por ano. Acrescente-se que, de acordo com o *World Drink Trends* de 2004, o consumo em L de etanol por pessoa e por ano em Portugal passou de 12,9 em 1990 para 10,3 em 2000 e em 2002 apresentava o valor de 9,7, encontrando-se acima da média da Europa ocidental e ocupando, inclusivamente, o 7º lugar no *ranking* mundial (Cunha, 2005).

Para além dos problemas de saúde associados ao seu consumo, o etanol interfere simultaneamente na vida pessoal, familiar, escolar, ocupacional e social do consumidor e, consequentemente, na sociedade em que se encontra inserido (Room, 2006). De facto, existem estimativas que equiparam o dano social induzido pelo etanol aos seus malefícios sobre a saúde (Room, 2006). No entanto, o problema do etanol, comparativamente a outras substâncias psicoactivas, tem sido abordado com uma certa

benevolência, tanto por parte da imprensa como pelas entidades de saúde pública. Acrescente-se que a mensagem transmitida à sociedade em geral relativa ao consumo de etanol é dúbia, porquanto por um lado as circunstâncias sociais e culturais, nomeadamente a propaganda e promoção de bebidas alcoólicas, fomentam e tornam possível o seu consumo generalizado, e por outro lado desenvolvem-se atitudes de repúdio relativas à ingestão excessiva destas mesmas bebidas. De forma global, a tolerância social concedida ao consumo de etanol e a escassa percepção do risco associado à sua ingestão em conjunto com a disponibilidade e acessibilidade do etanol por parte da população e a falta de regulamentação das condições e dos padrões de uso em contextos sociais específicos, têm contribuído para a generalização do consumo de etanol sendo esta conduta socialmente aceite. De facto, verifica-se ser cada vez mais precoce o início da ingestão de bebidas alcoólicas pelos adolescentes e jovens e maior a taxa de consumo de etanol pelos mesmos.

A dependência alcoólica é uma toxicodependência cuja patologia se encontra directamente associada ao consumo excessivo e compulsivo de etanol (Kalsi *et al.*, 2009), sendo definida como a associação de condições fisiológicas, comportamentais e cognitivas em que consumo de etanol se torna prioritário em detrimento de outros comportamentos anteriormente considerados relevantes pelo indivíduo (Kohnke, 2008). A susceptibilidade para o consumo excessivo e abusivo de etanol varia entre indivíduos, etnias e, até mesmo, países devido a diferenças na facilidade de obtenção, padrões culturais e religiosos e condições económicas de cada país (Chen & Yin, 2008). Acresce ainda que a dependência do etanol resulta da combinação de factores genéticos, físicos, psicológicos, sociais e ambientais (Chen & Yin, 2008) pelo que é um problema de difícil resolução. No entanto, os mecanismos base que influenciam a iniciação, a progressão e a gravidade das doenças relacionadas com a ingestão abusiva de etanol não se encontram ainda perfeitamente esclarecidos. Por outro lado, é do conhecimento geral que a abstinência alcoólica induz uma panóplia de complicações clínicas associadas à cessação ou redução do consumo de etanol (Koirala *et al.*, 2008). E, todavia, os estudos realizados nestas condições a nível hepático são escassos. De referir que surpreendentemente se desconhecem trabalhos que abordem a questão da abstinência a longo prazo, pelo que muito existe ainda por esclarecer relativamente às consequências celulares desta condição.

Também do ponto de vista médico-legal o alcoolismo tem importantes implicações uma vez que são frequentes os episódios trágicos associados ao consumo excessivo de etanol. Como é publicamente reconhecido, os problemas decorrentes da

ingestão de etanol vão desde as questões de saúde, física e mental, dos consumidores, aos problemas de relacionamento inter-pessoal e às questões de absentismo laboral e escolar. No entanto, o etanol está igualmente associado a elevada sinistralidade rodoviária ou do trabalho, violência familiar e comportamentos violentos, nomeadamente homicídios, suicídios e abuso sexual. Sabe-se, por exemplo, que os acidentes de viação relacionados com a ingestão de etanol constituem cerca de 25% dos acidentes rodoviários e, na União Europeia, estima-se que, pelo menos, 10000 vidas poderiam ser poupadas caso fosse eliminada a condução sob o efeito do etanol (Anderson & Baumberg, 2006). Já a nível laboral, a Organização Mundial de Saúde estima que a ingestão de etanol reduz a produtividade em mais de 10%, estando igualmente implicados aspectos de mortalidade e morbilidade acrescidas. Calcula-se ainda que o etanol é responsável por 4 em cada 10 homicídios e mortes violentas, 1 em cada 6 suicídios e por 1 em cada 3 mortes em acidentes rodoviários (Anderson & Baumberg, 2006). Entre as inúmeras patologias induzidas pela ingestão de etanol salientam-se as induzidas sob terceiros nomeadamente a síndrome de abstinência fetal e consequentes défices intelectuais e doenças sexualmente transmissíveis devidas a comportamentos considerados de risco. Com efeito, estudos epidemiológicos indicam que o consumo de etanol está associado a expressiva mortalidade e morbilidade, directa ou indirectamente. Mais, o alcoolismo tem ainda elevado impacto económico pois está relacionado com um número substancial de hospitalizações, incapacidades e morte prematura. Os aspectos médico-legais do etanol são por isso bastante complexos dada a multiplicidade de condicionantes e consequências que resultam frequentemente em questões cíveis e penais decorrentes da sua ingestão. Não obstante a condução de veículos sob influência do etanol e a venda de bebidas alcoólicas se encontrarem regulamentadas na legislação portuguesa, a informação, investigação e formação deverão ser opções fundamentais a ser tomadas no sentido de minimizar os problemas de saúde e sociais intrínsecos à ingestão de etanol.

Sendo uma molécula altamente solúvel em água, o etanol é facilmente distribuído a todos os tecidos do organismo induzindo efeitos perniciosos nos mesmos (Mukherjee *et al.*, 2007). Como exemplo da variedade de alvos da sua acção, refira-se que o consumo crónico de etanol é causa de inúmeras patologias gastroenterológicas, cardiovasculares, neurológicas, ósseas, imunológicas e musculares. No entanto, independentemente da quantidade ingerida, o etanol não é armazenado pelo organismo sendo completamente oxidado (Mukherjee *et al.*, 2007). Após ingestão oral, o etanol é rapidamente absorvido. Cerca de 20% da absorção ocorre no estômago, por difusão

passiva, e os restantes 80% são absorvidos a nível intestinal (Norberg *et al.*, 2003). A biotransformação do etanol ocorre predominantemente a nível hepático (Badger *et al.*, 2000; Nagy, 2004), essencialmente por oxidação, sendo o acetaldeído o primeiro metabolito a ser originado (Das & Vasudevan, 2007; Soderberg *et al.*, 2003). Porém, as consequências metabólicas da oxidação do etanol variam de acordo com a via utilizada na sua metabolização (Lieber, 1997; Nagy, 2004), ainda que as várias vias não actuem independentemente umas das outras. São 3 as principais enzimas responsáveis pela metabolização oxidativa do etanol nos hepatócitos: a desidrogenase alcoólica (ADH), o sistema de oxidação microssomal (MEOS) via citocromo P450 isoforma 2E1 (CYP2E1) e a catalase (CAT) (ver Figura 1) (Das & Vasudevan, 2007; Lieber, 1999; Liu *et al.*, 2005). Estas enzimas encontram-se amplamente distribuídas em numerosas células nos mamíferos (Liu *et al.*, 2005), mas é nos hepatócitos onde se expressam em níveis mais elevados (Donohue Jr., 2007). Independentemente da via utilizada na biotransformação do etanol, o acetaldeído formado é então oxidado passando a acetato por acção da desidrogenase aldeídica (ALDH) mitocondrial (Donohue Jr., 2007; Lieber, 1999). A eliminação do acetaldeído é um processo eficiente de tal forma que este metabolito altamente tóxico é eliminado pouco tempo depois da sua formação. Foi estimado que apenas 1 a 2% do acetaldeído formado a nível hepático atinge a circulação sanguínea (Gemma *et al.*, 2006). A forma activada do acetato, a acetilcoenzima A, pode também ela ser metabolizada conduzindo à formação de corpos cetónicos, aminoácidos e ácidos gordos (Agarwal, 2001). Acresce que, tanto a ADH como a ALDH utilizam a forma oxidada da nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+) como co-factor, convertendo-a na sua forma reduzida (NADH) (Das & Vasudevan, 2007). Consequentemente, durante a oxidação do etanol a razão NADH/NAD^+ apresenta-se significativamente aumentada, alterando o estado redox celular (Norberg *et al.*, 2003).

O fígado é um órgão particularmente sensível aos danos provocados pelo etanol graças ao efeito de primeira passagem. Acresce que o fígado recebe sangue, através da veia porta, directamente do tubo digestivo pelo que se encontra exposto a concentrações muito mais elevadas de etanol do que qualquer outro órgão (Karinch *et al.*, 2008). Para mais, é também vulnerável a alguns dos metabolitos do etanol, uma vez que é o principal local de degradação oxidativa nos mamíferos (Nagy, 2004), sendo muito secundário o papel desempenhado pelo tubo digestivo, pulmões e rins (Lieber, 1997). Embora a metabolização hepática do etanol seja levada a cabo pelas células parenquimatosas, os hepatócitos, as células não parenquimatosas são também marcadamente afectadas pelo consumo de etanol (Bautista & Spitzer, 1999). Por exemplo, foram demonstradas alterações funcionais nas células de Kupffer, nas células endoteliais dos sinusóides e nas células estreladas após o consumo crónico de etanol (Bautista & Spitzer, 1999).

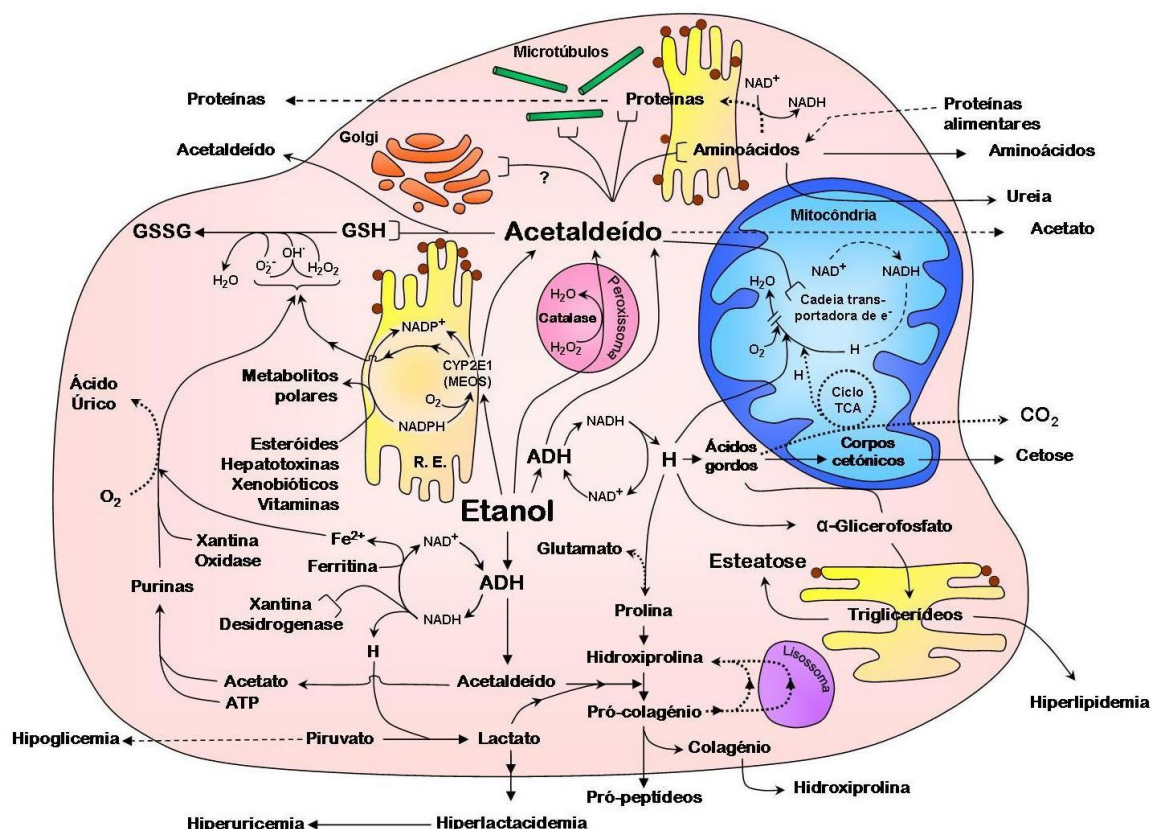


Figura 1. Degradação oxidativa do etanol nos hepatócitos (adaptado de Lieber, 1997).

O consumo crónico de etanol encontra-se também associado ao aumento dos níveis de endotoxinas (Mukherjee *et al.*, 2007; Yamashina *et al.*, 2005), uma vez que a sua ingestão aumenta a permeabilidade intestinal, conduzindo ao aumento de endotoxinas na circulação (Bautista & Spitzer, 1999). Curiosamente, foi demonstrado que este aumento é particularmente mais evidente em ratos do sexo feminino (Thurman *et al.*, 1999). Estas endotoxinas são, por sua vez, capazes de activar as células de Kupffer (Das & Vasudevan, 2007) induzindo a produção de várias substâncias biologicamente activas, nomeadamente citocinas e radicais livres (Bautista & Spitzer, 1999). Existe também evidência que, através da alcoolização crónica, a activação das células de Kupffer pelas endotoxinas pode contribuir para o estado hipermetabólico nas células parenquimatosas (Bunout, 1999) e, conseqüentemente, acarretar a indução de hipoxia nas regiões pericentraes dos lóbulos hepáticos (Thurman *et al.*, 1999).

Por outro lado, as células de Kupffer também podem ser activadas em consequência do stress oxidativo induzido pela metabolização do etanol (Järveläinen *et al.*, 2000), uma vez que no decorrer da oxidação do etanol são geradas espécies reactivas de oxigénio (ROS) (Hoek & Pastorino, 2002). As ROS são intermediários altamente reactivos que contribuem para os danos hepáticos induzidos pelo etanol (Jaeschke *et al.*, 2002). Em condições fisiológicas, estas espécies são contrabalançadas

por vários agentes antioxidantes endógenos. Todavia, quando as células de Kupffer são activadas, o balanço oxidante/antioxidante é alterado (Bautista & Spitzer, 1999). No entanto, as ROS também podem ser originadas por células de Kupffer activadas durante a fase inflamatória da alcoolização (Spolarics, 1998), aumentando ainda mais a disponibilidade destes intermediários. Não obstante as ROS poderem desencadear efeitos benéficos a nível hepático, devido à activação de efectores da resposta imune inata (Bogdan *et al.*, 2000), são igualmente capazes de promover danos oxidativos no fígado e de alterar o metabolismo hepático por modulação de processos chave de transdução de sinal, incluindo o factor de transcrição *Nuclear Factor kappa-B* (NF- κ B) (Nagy, 2003). Têm vindo a ser sugeridas várias vias na tentativa de explicar a forma pela qual o etanol é capaz de induzir stress oxidativo (Arteel, 2003; Cardin *et al.*, 2002; Cederbaum, 2001; Dey & Cederbaum, 2006; Tsukamoto & Lu, 2001). Admite-se a possível formação de aductos proteicos, diminuição da reparação dos danos presentes no ácido desoxirribonucleico (DNA), inactivação enzimática, alterações do estado redox, produção de acetaldeído, danos mitocondriais, mobilização do ferro pelo próprio etanol, depleção de antioxidantes, nomeadamente da glutathione citosólica e mitocondrial, processos inflamatórios e oxidação do etanol com formação de radicais.

As patologias associadas à ingestão de etanol encontram-se, frequentemente relacionadas com o défice nutricional apresentado pelos consumidores crónicos, em parte devido à capacidade que o etanol apresenta para interferir com o *up-take* e utilização dos vários nutrientes (Gemma *et al.*, 2006). Sabe-se que algumas dessas alterações metabólicas são dependentes de modificações no estado redox devido ao NADH gerado pela ADH hepática (Cardin *et al.*, 2002). Inicialmente, alterações na razão NADH/NAD⁺ nos hepatócitos fomentam alterações no metabolismo intermediário hepático (Nagy, 2004). Estas alterações têm repercussões importantes no fígado, favorecendo a síntese e a acumulação de ácidos gordos, impedindo a gluconeogénese e inibindo o ciclo de Krebs (Lieber, 2000). Curiosamente, esta alteração inicial do estado redox não se mantém após exposição continuada ao etanol. À medida que os organismos se vão adaptando a este tóxico, o estado redox tende a voltar a níveis normais (Salaspuro *et al.*, 1981) ao passo que outras vias de metabolização do etanol, entre as quais se inclui a catalisada pelo citocromo P450 (CYP), passam a ter um papel mais preponderante. O CYP é induzido durante a alcoolização prolongada, contribuindo não só para o seu metabolismo e tolerância, bem como para o aumento da formação de metabolitos potencialmente tóxicos (Karinch *et al.*, 2008). Esta indução do CYP pode contribuir igualmente para a vulnerabilidade aumentada a xenobióticos ubíquos (Lieber, 2000).

A exposição crónica ao etanol pode ainda conduzir a danos da função hepática através de vias independentes da sua metabolização, por exemplo, através da interacção directa do etanol com proteínas das membranas celulares envolvidas em vias de transdução de sinal (Peoples *et al.*, 1996). Cada um destes mecanismos complexos traduz-se em alterações da expressão génica hepática conduzindo, em última instância, à progressão da doença hepática alcoólica (Lieber, 2000). As características histopatológicas da doença hepática alcoólica são diversas. Virtualmente, todas as formas de patologia hepática podem ser encontradas em indivíduos com historial de consumo crónico de etanol. Nos roedores, a administração crónica de etanol conduziu a inúmeras alterações hepáticas, incluindo esteatose, necrose, infiltração de células inflamatórias, proliferação de retículo endoplasmático liso e aberrações mitocondriais (Tsukamoto *et al.*, 1985). A progressão dos danos hepáticos derivados do consumo de etanol caracteriza-se, inicialmente, pelo aparecimento de excesso de ácidos gordos, seguindo-se fases de inflamação, necrose e apoptose até ao aparecimento de fibrose hepática e, em situações extremas, cirrose (Nagy, 2004). A esteatose é considerada como sendo a resposta mais usual do fígado ao consumo de etanol (Donohue Jr., 2007). Não obstante ter sido considerada como um efeito secundário pouco relevante em consumidores crónicos de etanol, têm surgido evidências de que a esteatose alcoólica aumenta a susceptibilidade do fígado para o desenvolvimento de patologias mais severas quando o consumo de etanol persiste (Donohue Jr., 2007). A razão pela qual a doença hepática progride mais rapidamente em alguns indivíduos não se encontra ainda esclarecida, no entanto, alguns investigadores adoptaram o conceito de que a esteatose será seguida da produção de citoquinas, disfunção mitocondrial e/ou stress oxidativo (Donohue Jr., 2007).

Sabe-se ainda que as lesões induzidas pelo etanol são de magnitude consideravelmente distinta quando se analisa a sua hepatotoxicidade no sexo feminino ou no masculino sendo, grosso modo, os seus efeitos tóxicos claramente mais nefastos na mulher (Dettling *et al.*, 2007). Sabe-se que o sexo feminino desenvolve com maior facilidade danos e patologias hepáticas mediante alcoolização (Dettling *et al.*, 2007; Nanji *et al.*, 2002; Schenker, 1997), manifestando efeitos adversos agravados ainda que ingerindo menor quantidade de etanol (Dettling *et al.*, 2007; Imuro *et al.*, 1997) e durante um menor período de consumo (Colantoni *et al.*, 2000) que o sexo masculino. A incidência de fases avançadas de doença hepática é maior entre os consumidores crónicos de etanol do sexo feminino e a probabilidade de desenvolver cirrose alcoólica aumenta consideravelmente à medida que o consumo continuado de etanol se mantém

(Tuyns & Pequignot, 1984). Com efeito, as mulheres desenvolvem cirrose hepática alcoólica em idades mais precoces e após menor consumo cumulativo de etanol que os homens (Thomasson, 2000). Existem diferenças biológicas entre os dois sexos que resultam numa resposta dimórfica ao etanol, tanto farmacocinética como farmacodinâmica (Schwartz, 2003) que levam à vulnerabilidade aumentada do género feminino para a toxicidade induzida pelo etanol. São várias as explicações possíveis para este facto por exemplo as diferenças de peso corporal, teor de água e absorção, disponibilidade e metabolização do etanol.

A base em que assenta a sensibilidade aumentada do sexo feminino para as consequências do consumo de etanol é ainda pouco clara, no entanto, há dados que sugerem serem os níveis elevados de estrogénios o factor determinante dessa maior vulnerabilidade (Maher, 1998). Estudos realizados em ratos ovariectomizados expostos ao etanol demonstraram que estes desenvolvem danos hepáticos menos graves do que fêmeas controlo, tendo sido também observado que a suplementação hormonal de fêmeas gonadectomizadas aumenta a gravidade das lesões hepáticas para níveis semelhantes aos observados em animais intactos (Nanji *et al.*, 2002). Por outro lado sabe-se que a apetência das fêmeas para a ingestão voluntária de etanol varia de acordo com a fase do ciclo éstrico (Crippens *et al.*, 1999), havendo correlação positiva entre os níveis plasmáticos de estradiol e o consumo de etanol e sendo o efeito máximo observado para concentrações fisiológicas de estradiol (Ford *et al.*, 2004). Trabalhos realizados no Homem (Dettling *et al.*, 2008) e em roedores (Mezey, 2000) mostraram que os estrogénios aumentam a actividade da ADH particularmente no fígado (Dettling *et al.*, 2007). Por outro lado, foi já relatado que os estrogénios exógenos reduzem significativamente a taxa de eliminação do etanol (Colantoni *et al.*, 2000). Sabe-se ainda existir uma relação directa entre os níveis de progesterona e a cinética de eliminação do etanol, estando níveis mais elevados de progesterona associados a aumentadas taxas de eliminação (Dettling *et al.*, 2008; Sutker *et al.*, 1987). No entanto, crê-se que a aumentada farmacocinética do etanol no sexo feminino não se deve exclusivamente à influência da progesterona mas sim à razão entre os níveis de progesterona e estradiol (Sutker *et al.*, 1987).

Conforme foi já referido, o metabolismo do etanol ocorre predominantemente no fígado, um *sex hormone responsive organ*, que reage distintamente aos estrogénios e aos androgénios (Colantoni *et al.*, 2000), tendo sido já identificadas proteínas e enzimas *hormone responsive*. Tanto os hepatócitos como as células não parenquimatosas do fígado expressam receptores de estrogénios e de androgénios (Roy & Chatterjee, 1983). Mais, o fígado responde aos estrogénios aumentando a síntese e a secreção de várias glicoproteínas plasmáticas (Colantoni *et al.*, 2000). Presume-se ainda que os estrogénios

promovam a actividade das células de Kupffer (Ikejima *et al.*, 1998), os macrófagos residentes do fígado, células estas que desempenham um papel central na patogénese hepática induzida pelo etanol uma vez que são responsáveis pela produção de mediadores pró-inflamatórios e tóxicos (Thurman, 1998), entre os quais as ROS. Todavia, são escassos os estudos que correlacionam a farmacocinética deste xenobiótico com os níveis de hormonas sexuais femininas. As diferenças sexuais no metabolismo do etanol podem igualmente estar correlacionadas com diferenças do volume de distribuição, massa muscular e teor total de água e lípidos corporais entre os dois sexos (Dettling *et al.*, 2008). O etanol tem solubilidade nos lípidos, não se liga a proteínas plasmáticas (Norberg *et al.*, 2003) e uma vez na circulação sanguínea distribui-se uniformemente pela água corporal (Gemma *et al.*, 2006; Thomasson, 2000), cujo volume é substancialmente menor no sexo feminino. Acresce ainda, o maior teor lipídico do sexo feminino, o que contribui para um ainda menor volume de distribuição (Schwartz, 2003) uma vez que o etanol apresenta uma reduzida solubilidade nos lípidos. De salientar ainda que o sexo feminino apresenta uma massa hepática relativa superior como resultado de um menor volume de distribuição, pelo que a razão massa hepática/volume de distribuição pode desempenhar um papel importante na farmacocinética do etanol neste sexo (Dettling *et al.*, 2008). O aumento da taxa de eliminação do etanol foi proposta como possível explicação para a maior vulnerabilidade do sexo feminino para patologias hepáticas associadas ao consumo deste (Thomasson, 2000), uma vez que conduz a níveis mais elevados de acetaldeído plasmático (Nanji *et al.*, 2002; Schenker, 1997), o mesmo tendo sido já previamente demonstrado em animais de experimentação (Crippens *et al.*, 1999).

Se a toxicidade do etanol, tendo apenas em linha de conta o sexo, fosse simplesmente consequência do género feminino se encontrar exposto a maior quantidade de etanol, ainda que consumindo igual quantidade que o masculino, a razão da vulnerabilidade aumentada do primeiro seria facilmente explicada. A variabilidade observada na farmacocinética do etanol deriva da combinação de factores genéticos e ambientais, bem como de uma disponibilidade não linear de etanol (Norberg *et al.*, 2003).

OBJECTIVO DO TRABALHO

Com esta dissertação pretende-se contribuir para o esclarecimento dos efeitos e dos mecanismos de hepatotoxicidade associados ao consumo crónico de etanol e à sua abstinência na mulher, dado que o mecanismo preciso através do qual o etanol exerce a sua toxicidade, directa ou indirecta, não se encontra ainda claramente definido.

Centrou-se o modelo experimental na fêmea porque a maioria dos estudos existentes foram efectuados em machos e estes têm diferente ambiente hormonal comparativamente às fêmeas. Acresce que no sexo feminino existe ainda uma notória variação hormonal ao longo do ciclo menstrual, pelo que se focou o presente trabalho no estudo do papel que os estrogénios podem desempenhar numa potencial resposta dimórfica do fígado ao etanol.

Realça-se que os estudos se centraram no fígado porque a informação actualmente disponível sobre os efeitos bioquímicos da abstinência alcoólica neste órgão são escassos. Curiosamente constatou-se que a maioria dos estudos existentes é relativa aos seus efeitos no sistema nervoso central e foram realizados na fase aguda da privação alcoólica, na qual são evidentes os sinais da síndrome de abstinência. O estudo da abstinência prolongada de etanol no fígado parece-nos, pois, importante uma vez que poderá contribuir para elucidar a eventual recuperação, cessação ou agravamento das alterações metabólicas que se observam durante a ingestão continuada de etanol.

Este estudo teve como objectivo avaliar *in vivo* a influência dos estrogénios nos efeitos da alcoolização crónica e abstinência alcoólica prolongada sobre o fígado. Com este fim, foram realizados ensaios em fêmeas da estirpe Wistar tendo sido avaliados os seguintes parâmetros:

- resposta hormonal ao stress, através da determinação dos níveis séricos de corticosterona;
- stress oxidativo, através dos níveis de malonildialdeído (MDA), indicativos de peroxidação lipídica, da oxidação proteica e do teor de glutathiona, tanto reduzida (GSH) como oxidada (GSSG);
- apoptose, através da activação da caspase 3, da concentração de citocromo c (cyt c) citosólica e do nível de proteína *B-cell lymphoma-2* (Bcl-2);
- resposta inflamatória, através da translocação nuclear das subunidades p50 e p65 do factor de transcrição NF-κB.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

As observações foram realizadas em ratos fêmea da estirpe Wistar provenientes do biotério do Instituto de Biologia Molecular e Celular do Porto. A partir dos 30 dias de idade, os animais foram mantidos no biotério do Instituto de Anatomia da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto em condições controladas de temperatura (20-22°C) e humidade (40-60%) e submetidos a ciclos de dia/noite (12/12h).

Procedeu-se, durante todo o período experimental, à monitorização da evolução dos pesos corporais, da ingestão de dieta sólida e da ingestão de líquidos. Foi também efectuada a colheita de sangue total, a partir da veia dorsal da cauda. As amostras foram colhidas quinzenalmente desde o primeiro mês de tratamento até ao final do período experimental, 2 vezes por dia, às 10 e às 22 horas, nos animais submetidos a alcoolização. A recolha das amostras foi realizada nestas duas horas distintas para o estudo dos ritmos circadianos.

Utilizaram-se, na totalidade, 40 animais que se distribuíram pelos 4 grupos seguintes:

i) Controlo puro (CP; n=10): animais aos quais foi permitido o consumo *ad libitum* de dieta sólida adequada para ratos de laboratório (*Diete Standard Certificate da Mucedola*, Milão, Itália) e de água entre os 2 e os 8 meses de idade.

ii) Controlo nutricional (PF; n=10): animais aos quais foi fornecida uma quantidade de dieta sólida previamente calculada de forma a que a sua ingestão calórica fosse equiparável à dos animais submetidos a alcoolização crónica e aos quais foi permitido o consumo *ad libitum* de água entre os 2 e os 8 meses de idade.

iii) Alcoolização crónica (ETOH; n=10): animais aos quais foi permitido o consumo *ad libitum* de dieta sólida e de solução de etanol a 20% (v/v) como única fonte de ingestão líquida entre os 2 e os 8 meses de idade. A introdução do etanol foi efectuada de forma progressiva, tendo-se iniciado a administração com a percentagem de 5% (v/v), percentagem esta aumentada 5% a cada 3 dias consecutivos até se atingir a percentagem pretendida.

iv) Abstinência alcoólica (WD; n=10): animais submetidos às mesmas condições que os animais submetidos a alcoolização crónica até aos 8 meses de idade, altura em que foi efectuada a desabitação do etanol de forma progressiva, tendo a percentagem de etanol sido reduzida 5% a cada 3 dias consecutivos até à sua retirada completa. Findo este período, os animais dispuseram *ad libitum* de água como fonte de ingestão líquida até aos 10 meses de idade.

Quinze dias antes do fim dos diferentes períodos experimentais, os animais foram ovariectomizados bilateralmente. As gonadectomias foram efectuadas através de incisão da parede abdominal ventral dos animais. Para tal, os animais foram previamente anestesiados tendo sido administrados sequencialmente, e a intervalos de 10 minutos, Fenergan (0,4 mL/Kg de peso corporal; Prometazina, Laboratórios Vitória S.A., Amadora, Portugal), Xylazina (0,132 mL/Kg de peso corporal; Hidroclorato de dimetilfenilaminodihidrotiazina, Sigma-Aldrich Química S.A., Sintra, Portugal) e Ketalar (0,5 mL/Kg de peso corporal; Cetamina, Laboratórios Pfizer Lda., Lisboa, Portugal). Após a remoção das gónadas, os animais foram devidamente suturados. Para prevenir a desidratação, os animais foram injectados, por via subcutânea, com 10 mL de soro fisiológico, no início do período de recobro.

Metade dos animais de cada tratamento (n=5) foram, nos 3 dias que antecederam a morte, injectados com 17- β -estradiol, de forma a mimetizar a fase éstrica de proestro, e os restantes (n=5) foram injectados com veículo (óleo de sésamo), de forma a mimetizar a fase éstrica de diestro. Esta administração foi efectuada de acordo com o descrito em estudos prévios (Bottner & Wuttke, 2006; Figueiredo *et al.*, 2007), tendo ocorrido sempre entre as 9 e as 10 horas da manhã.

No final do período de tratamento, isto é, aos 10 meses de idade para os animais submetidos a abstinência alcoólica e aos 8 meses de idade para os animais dos restantes tratamentos, os animais foram sacrificados por decapitação. Para efeitos de normalização de resultados, a morte dos animais ocorreu sempre entre as 14 e as 16h30m. O fígado foi isolado e dissecado procedendo-se, posteriormente, à sua colheita. Após a sua pesagem foi congelado o mais prontamente possível em azoto líquido e armazenado a - 80°C. Imediatamente a seguir, recolheram-se 8 mL de sangue da aorta abdominal de todos os animais para ulterior quantificação de algumas hormonas. Finalmente, os úteros foram dissecados e retirados em todos os animais pertencentes aos diversos grupos experimentais. Após terem sido pesados, foram preservados em paraformaldeído a 8% (v/v).

2. PARÂMETROS ANALISADOS E METODOLOGIAS

2.1. SORO

O soro obtido foi utilizado para proceder à determinação da alcoolémia e doseamentos hormonais, nomeadamente estradiol, progesterona e corticosterona.

Após a colheita do sangue permitiu-se a sua coagulação em ambiente refrigerado (2 a 6°C). Uma vez completa a coagulação, o sangue foi centrifugado 2 vezes a 2000 rpm durante um período de 10 minutos. O soro sobrenadante foi então armazenado em alíquotas de 300 µL a -80°C até ulterior quantificação dos parâmetros supra-mencionados.

Para a determinação da alcoolémia foi necessário efectuar uma precipitação prévia das proteínas presentes no soro. Para esse efeito, foi adicionado HClO₄ 10% (m/v) a igual volume de soro tendo a mistura permanecido em repouso durante 5 minutos em gelo. Findo esse período, foi adicionado KHCO₃ 0,76 M, as amostras foram submetidas a agitação vigorosa e centrifugadas durante 1 minuto a 5000 rpm. Por último, as amostras foram diluídas em tampão de ensaio.

Para avaliar os níveis de corticosterona, as amostras de soro foram previamente descongeladas à temperatura ambiente e, posteriormente, foram diluídas 1:10 em tampão à base de proteínas de acordo com as instruções do fornecedor.

2.1.1. Etanol

O doseamento foi efectuado através de um kit colorimétrico comercial (BioVision Incorporated, Califórnia, EUA) de acordo com as instruções do fornecedor.

Resumidamente, adicionaram-se, em triplicado, 50 µL por poço de amostra, branco e de cada um dos padrões utilizados na construção da recta de calibração [padrões de etanol: 0,04; 0,08; 0,12; 0,16 e 0,2 mM]. De seguida, adicionaram-se 50 µL por poço de mistura reaccional [46 µL de tampão de ensaio, 2 µL de sonda e 2 µL de mistura enzimática]. Após um período de incubação de 30 minutos, a 37°C e na ausência de luz, foi medida a densidade óptica a 570 nm em leitor de placas. O kit apresentava como limite de detecção mínimo 0,4 ppm de etanol. Os resultados apresentam-se expressos em g etanol por L.

2.1.2. Corticosterona

A quantificação dos níveis de corticosterona foi efectuada através de um kit de *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) comercial (AssayPro, St. Charles, MO, EUA) que tem por base um imunoensaio competitivo em sanduíche.

À placa revestida com anticorpo policlonal anti-corticosterona foram adicionados, em triplicado, respectivamente, 25 µL de branco, de amostra e de cada um dos padrões utilizados na construção da recta de calibração [padrões de corticosterona: 0,098; 0,391; 1,563; 6,250; 25 e 100 ng/mL]. Imediatamente a seguir, adicionaram-se 25 µL por poço de corticosterona biotinilada, após o que se permitiu a incubação da placa por um período de 60 minutos. Seguiu-se um passo de lavagem, findo o qual foram adicionados 50 µL por poço de peroxidase de rábano (HRP) conjugada com estreptavidina e a placa incubou durante 30 minutos. Repetiu-se o processo de lavagem e adicionaram-se 50 µL por poço de substrato cromogénico tetrametilbenzidina (TMB). Após a sua adição, permitiu-se a incubação da placa tendo sempre o cuidado de monitorizar o desenvolvimento da cor. Finalmente, foram adicionados 50 µL por poço de HCl 0,5N e efectuou-se a leitura da densidade óptica a 450 nm num leitor de placas. O limite mínimo de detecção do kit utilizado é de 40 pg de corticosterona por mL e apresenta coeficientes de variação intra- e inter-ensaio de 5,0% e 7,0%, respectivamente. Os resultados apresentam-se expressos em ng de corticosterona por mL.

2.1.3. 17-β-Estradiol e progesterona

O doseamento de estradiol e de progesterona foi efectuado simultaneamente. Os níveis de ambas as hormonas foram avaliados através de imunoensaio competitivo de fase sólida de enzimas quimioluminescentes através de kits comerciais adquiridos à Siemens Healthcare Diagnostics, Inc. (Tarrytown, N.Y., EUA).

De forma resumida, cada tubo de análise continha a respectiva fase sólida revestida com anticorpo policlonal anti-estradiol ou anti-progesterona. Os reagentes posteriormente utilizados continham, respectivamente, fosfatase alcalina conjugada com estradiol ou com progesterona. Desta forma, o conjugado enzima-hormona competiu com a respectiva hormona da amostra para locais de ligação do anticorpo presente na fase sólida. O excesso de amostra e de reagentes foi removido por passos de lavagem centrífuga e, finalmente, foi adicionado o substrato quimioluminescente sendo o sinal obtido proporcional à quantidade de enzima ligada à fase sólida. Os ensaios foram monitorizados através de padrões internos e a sensibilidade analítica dos mesmos foi de

15 pg por mL para o estradiol e de 0,1 ng por mL para a progesterona. Os resultados encontram-se expressos em pg por mL para o estradiol e em ng por mL para a progesterona.

2.2. FÍGADO

As amostras de fígado colhidas foram utilizadas para proceder à determinação da peroxidação lipídica, grupos carbonilo, GSH e oxidada GSSG, proteína Bcl-2, caspase 3, cyt c citosólico, factor de transcrição NF- κ B (subunidades p50 e p65) e ainda do conteúdo proteico para normalização dos resultados.

A quantificação do conteúdo proteico das amostras destinadas ao doseamento de MDA, grupos carbonilo, GSH e GSSG foi efectuada com base no método descrito por Lowry e colaboradores (1951). Para tal, foram pipetados, em triplicado, 50 μ L dos padrões [padrões de albumina bovina sérica (BSA): 25; 50; 100; 150; 200; 225 e 250 μ g/mL, preparados em NaOH 0,3 M], igual volume de branco [NaOH 0,3 M] e das amostras para placas de 96 poços. Em seguida, adicionaram-se a cada poço 100 μ L de solução reagente A [Na_2CO_3 2% (m/v), CuSO_4 1% (m/v) e $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 2% (m/v)]. A placa permaneceu em incubação durante 10 minutos à temperatura ambiente e na ausência de luz. Finda a incubação, adicionaram-se 100 μ L de solução reagente B [reagente de Folin Ciocalteau em H_2O desionizada] e permitiu-se uma nova incubação da placa em condições semelhantes às anteriores mas por um período de 20 minutos. Finalmente, efectuou-se a leitura da densidade óptica a 750 nm em leitor de placas (Infinite M200, Tecan). Com base na recta de calibração, procedeu-se ao cálculo da concentração proteica das amostras, tendo os resultados sido expressos em mg de proteína por mL. A quantificação proteica das amostras destinadas à avaliação da presença dos grupos carbonilo foi efectuada separadamente para as amostras branco e para as amostras teste e só após a solubilização com guanidina para que a perda de proteínas durante o processo de lavagem fosse devidamente contabilizada.

O conteúdo proteico para os restantes doseamentos, proteína Bcl-2, caspase 3, cyt c citosólico e factor de transcrição NF- κ B (subunidades p50 e p65), foi avaliado com base no método descrito por Bradford (1976). Resumidamente, foram adicionados, por poço e em triplicado, respectivamente, 15 μ L de branco [NaOH 0,5 N], amostras e padrões [padrões de BSA: 0,156; 0,3125; 0,625; 1,25; 2,5 e 5 mg/mL, preparados em NaOH 0,5 N], aos quais se adicionaram 300 μ L de reagente de Bradford [1 parte de

solução mãe de Bradford¹: 7 partes de H₂O desionizada]. A mistura foi agitada orbitalmente durante 30 segundos seguindo-se uma incubação de 10 minutos à temperatura ambiente e na ausência de luz. Findo o período de incubação, efectuou-se a leitura da densidade óptica a 595 nm. O conteúdo proteico dos extractos foi determinado através da recta de calibração obtida a partir dos padrões. Os resultados encontram-se expressos em mg de proteína por mL.

2.2.1. Peroxidação lipídica

A extensão da peroxidação lipídica foi quantificada com base na formação de substâncias reactivas do ácido tiobarbitúrico (denominadas por TBARS), adaptada para leitor de placas, de acordo com a descrição de Santos-Marques e colaboradores (2006), uma vez que o MDA é capaz de formar um aducto cromogénico, de coloração vermelha estável, com duas moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA) (Lefèvre *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1997).

Para tal, procedeu-se à homogeneização de uma porção de fígado num homogeneizador de vidro-teflon em ácido tricloroacético (TCA) 10% (m/v) até à obtenção de uma suspensão homogénea. Desta suspensão foi retirada uma alíquota para a determinação do conteúdo proteico da amostra. De seguida, o homogeneizado foi centrifugado durante 20 minutos a 13000 rpm e a 4°C. Terminada a centrifugação, recolheu-se o sobrenadante e deste foram retirados 400 µL aos quais foi adicionado igual volume de solução TBA 1% (m/v). A mistura foi colocada em banho de água a 100°C durante 30 minutos. Após este período, permitiu-se o arrefecimento da mistura à temperatura ambiente e procedeu-se, de imediato, à quantificação. Foram então adicionados, em triplicado, 200 µL por poço de cada amostra e efectuou-se a leitura da densidade óptica a 535 nm. Os resultados apresentam-se expressos em nmol de equivalentes de MDA por mg de proteína, tendo sido utilizado um coeficiente de extinção molar de $1,17 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

2.2.2. Grupos carbonilo

A presença de grupos carbonilo (aldeídos e cetonas) foi determinada com base na metodologia colorimétrica descrita por Levine e colaboradores (1994), que tem como

¹ Solução mãe de Bradford: 50 mg de Coomassie Blue em C₂H₅OH 95% (v/v) e H₃PO₄ 85% (v/v).

princípio a reacção entre os grupos carbonilo presentes nas proteínas e a 2,4-dinitrofenilidrazina (DNPH) com formação de 2,4-dinitrofenilidrazona.

Para o efeito, homogeneizou-se uma porção de fígado em TCA 10% (m/v) até à obtenção de uma suspensão homogénea. De seguida, foi efectuada a divisão da suspensão em duas partes iguais e centrifugaram-se ambas a 13000 rpm, a 4°C durante 10 minutos. O sobrenadante resultante foi rejeitado e ao sedimento foram adicionados respectivamente DNPH 10 mM em HCl 2 M ou HCl 2 M, consoante se tratava da amostra teste ou da amostra branco. As amostras permaneceram em agitação vigorosa durante 60 minutos à temperatura ambiente. Uma vez terminada a agitação, adicionou-se TCA 20% (m/v). As amostras sofreram então agitação vigorosa tendo-se permitido o seu repouso em gelo após o qual as amostras foram centrifugadas durante 15 minutos a 13000 rpm e a 4°C. Seguiu-se um passo de lavagem com uma mistura de C₂H₅OH absoluto e CH₃COOCH₂CH₃ (1:1) repetido 3 vezes consecutivas. Cada passo de lavagem incluiu agitação vigorosa seguida de um período de repouso de 10 minutos em gelo e, por último, centrifugação das amostras durante 15 minutos a 13000 rpm e à temperatura de 4°C. Foi então adicionado CH₅N₃·HCl 6 M em H₃PO₄ 20 mM (pH 2,3), tendo as amostras permanecido em agitação durante a noite à temperatura ambiente. Na manhã seguinte, as amostras foram centrifugadas a 6500 rpm durante 15 minutos e a 4°C, tendo o sedimento sido rejeitado. Do sobrenadante foi retirada uma alíquota para quantificação proteica das amostras. Finalmente, adicionaram-se, em triplicado, as amostras branco e as amostras teste a placas de 96 poços e efectuou-se a leitura da densidade óptica a 380 nm em leitor de placas. Para obtenção dos resultados, a densidade óptica das amostras branco foi subtraída à das amostras teste. Os resultados apresentam-se expressos em nmol de grupos carbonilo por mg de proteína, usando um coeficiente de extinção molar de $1,65 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

2.2.3. Glutathione

A determinação dos níveis de glutathione reduzida e oxidada foi efectuada com base no ensaio glutathione reductase (GR) - ácido 5,5-ditio-bis(2-nitrobenzóico) (DTNB), de acordo com o descrito por Anderson (1985) mas adaptado para leitor de placas, no qual a GSH é convertida pelo DTNB em GSSG com a consequente formação do ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB).

Foi efectuada a homogeneização de uma porção de fígado em HClO₄ 5% (m/v) num homogeneizador de vidro-teflon, até obtenção de uma suspensão homogénea, da qual foi retirada uma alíquota para determinação do conteúdo proteico das amostras.

Posteriormente, centrifugou-se o homogeneizado a 13000 rpm, durante 20 minutos e a 4°C. O sobrenadante foi recolhido e preservado de imediato a -20°C até ao momento da determinação dos níveis de glutathiona.

2.2.3.1. Glutathiona reduzida

As amostras foram diluídas em HClO₄ 5% (m/v). De seguida, foram retirados 350 µL de amostra diluída, igual volume dos padrões utilizados na construção da recta de calibração [padrões de GSH: 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10 e 15 nmol/mL em HClO₄ 5% (m/v)] e de branco [HClO₄ 5% (m/v)] e, posteriormente, foi adicionado igual volume de KHCO₃ 0,76 M. Procedeu-se à sua agitação e ulterior centrifugação a 13000 rpm, a 4°C, durante 1 minuto. Por fim, foi realizado o respectivo ensaio enzimático. A velocidade de formação do TNB pode ser monitorizada através de ensaio enzimático, sendo proporcional à soma dos níveis de GSH e GSSG (em equivalentes de GSH).

Para o efeito, o leitor de placas foi programado na função cinética para leitura da absorção no comprimento de onda de 415 nm, durante o período de 3 minutos em intervalos de 10 em 10 segundos à temperatura de 30°C. O ensaio foi efectuado em placas de 96 poços, tendo sido realizada a leitura de cada amostra, padrão e branco em triplicado. Foram adicionados a cada poço 100 µL de branco, amostra e padrão respectivamente, volume ao qual se adicionou, posteriormente, 65 µL de solução reagente [DTNB 0,7mM em solução tampão de glutathiona, NADPH 0,24 mM em solução tampão, H₂O desionizada]. As placas permaneceram em incubação, a 30°C e no escuro, por um período de 15 minutos. Finda a incubação, adicionou-se GR 10 U/mL em solução tampão de glutathiona [Na₂HPO₄·2H₂O 71,5 mM, NaH₂PO₄·2H₂O 71,5 mM, EDTA 0,62 mM; pH 7,5] e procedeu-se à leitura da absorvância. Desta forma, foi assim registada a variação da absorvância o que permitiu o cálculo da velocidade de formação de TNB (declive da recta). A determinação da glutathiona presente nos extractos foi obtida por intrapolação a partir da recta de calibração obtida a partir dos padrões. O nível de GSH foi calculado por subtracção do nível de GSSG (em equivalentes de glutathiona reduzida) ao nível de glutathiona total. Os resultados encontram-se expressos em nmol de glutathiona por mg de proteína com base na respectiva curva de calibração.

2.2.3.2. Glutathiona oxidada

O nível de GSSG nas amostras foi monitorizado através do método descrito para a GSH. Assim, foram retirados 350 µL de amostra, igual volume dos padrões utilizados

na construção da recta de calibração [padrões de GSSG: 0,5; 1; 2; 4 e 8 nmol/mL preparados em HClO₄ 5% (m/v)] e de branco [HClO₄ 5% (m/v)] aos quais foi adicionada 2-vinilpiridina² tendo as amostras permanecido em agitação vigorosa, a 4°C, durante 60 minutos. Findo este período de tempo, adicionaram-se 350 µL de KHCO₃ 0,76 M. Após agitação vigorosa procedeu-se à centrifugação a 13000 rpm, a 4°C, durante 1 minuto. Finalmente, efectuou-se o ensaio enzimático (ver ponto 2.2.3.1.). Os resultados foram obtidos por intrapolação a partir da recta de calibração e encontram-se expressos em nmol de glutatona por mg de proteína com base na respectiva curva de calibração.

2.2.4. Proteína Bcl-2

Para avaliar o nível da proteína Bcl-2 a nível citoplasmático foi necessário preparar previamente extractos citoplasmáticos de cada amostra. Para tal, uma porção de fígado foi homogeneizado em tampão de lise celular AC [HEPES 10 mM, MgCl₂ 1,5 mM, KCl 10 mM, EDTA 0,5 mM e EGTA 0,1 mM; pH 7,9] suplementado no momento da utilização com ditioneitol (DTT) 200 mM e fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 50 mM. Após a homogeneização foi adicionado IGEPAL. As amostras foram vortexadas, incubadas durante 15 a 30 minutos em gelo e centrifugadas, a 4°C e a 6000 rpm, durante 10 minutos. Os sobrenadantes (extractos citoplasmáticos) foram recolhidos e armazenados a -80°C, para evitar a perda da actividade da proteína, até posterior análise. Os sedimentos foram também preservados a -80°C para posterior obtenção de extractos nucleares.

Esta proteína foi doseada através de um kit de ELISA comercialmente disponível adquirido à Bender MedSystems (Lausen, Suíça). De forma sucinta, após lavagem da placa revestida com anticorpo monoclonal anti-Bcl-2, foram adicionados, em triplicado, 100 µL por poço de amostra, branco e padrão [padrões de Bcl-2: 0,5; 1; 2; 4; 8; 16 e 32 ng/mL] e, posteriormente, 50 µL por poço de anticorpo monoclonal anti-Bcl-2 conjugado com biotina. A placa permaneceu em incubação durante 120 minutos à temperatura ambiente e com agitação de 100 rpm. Seguiu-se um novo passo de lavagem, após o qual foram adicionados 100 µL por poço de HRP conjugada com estreptavidina. Permitiu-se uma nova incubação da placa durante 60 minutos à temperatura ambiente e com agitação de 100 rpm. Finda a incubação, a placa foi novamente submetida a um passo de lavagem, tendo-se depois adicionado 100 µL de substrato cromogénico TMB. O

² A vinilpiridina vai reagir com a GSH e, desta forma, esta deixa de estar disponível tornando possível o cálculo do nível de GSSG presente (Vandeputte *et al.*, 1994).

desenvolvimento da coloração foi monitorizado durante 10 minutos e, por fim, adicionaram-se 100 µL por poço de H₃PO₄ 1 M. Procedeu-se, de imediato, à leitura da densidade óptica a 2 comprimentos de onda distintos: 450 nm como comprimento de onda de leitura e 620 nm como comprimento de onda de referência. O limite mínimo de detecção do ensaio é de 0,5 ng por mL, sendo o coeficiente de variação intra- e inter-ensaio, respectivamente, de 8,6% e de 12,0%. Os resultados encontram-se expressos em ng de proteína Bcl-2 por mg de proteína.

2.2.5. Citocromo c citosólico

Para proceder à quantificação do cyt c libertado das mitocôndrias foi necessário efectuar a subdivisão celular das amostras de forma a obter apenas a fracção citosólica que foi posteriormente analisada. Com vista a esse fim, uma porção de fígado foi homogeneizada em tampão [Tris-HCl 10 mM, sacarose 0,3 M, aprotinina 10 µM, pepstatina 10 µM, leupeptina 10 µM e PMSF 1 mM; pH 7,5]. De seguida, centrifugou-se a amostra a 10300 rpm, a 4°C, durante 60 minutos. O sobrenadante, fracção citosólica, foi recolhido e analisado de imediato como recomendado pelo fornecedor. O sedimento foi conservado de imediato a -80°C para posterior obtenção da fracção mitocondrial.

A quantificação do cyt c no citosol foi efectuada por ELISA tendo sido seguidas as indicações do fornecedor (Chemicon, Madrid, Espanha). Resumidamente, foram adicionados, em triplicado, 100 µL por poço de amostra, branco e padrão [padrões de cyt c: 0,156; 0,3125; 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10 e 20,00 ng/mL] numa placa de 96 poços pré-revestida com anticorpo monoclonal anti-cyt c. De seguida permitiu-se a incubação da placa durante um período de 120 minutos à temperatura ambiente e com agitação de 100 rpm. Findo esse período, os poços foram submetidos a um passo de lavagem. Posteriormente, adicionaram-se 100 µL por poço de anticorpo monoclonal biotinilado anti-cyt c e permitiu-se a sua incubação à temperatura ambiente com agitação de 100 rpm durante 120 minutos. Em seguida, os poços foram sujeitos uma vez mais a um passo de lavagem. Foram então adicionados 100 µL por poço de HRP conjugada com estreptavidina e placa permaneceu em incubação nas mesmas condições de temperatura e agitação durante 60 minutos. Após lavagem adicionaram-se de imediato 100 µL por poço de substrato cromogénico TMB, tendo-se permitido o desenvolvimento da coloração. A reacção enzimática foi então interrompida através da adição de uma solução acídica de paragem. O limite mínimo de detecção do kit é de 0,31 ng por mL. Os resultados encontram-se expressos em ng cyt c por mg de proteína.

2.2.6. Caspase 3

Homogeneizou-se uma porção de fígado em tampão de lise [Na-EDTA 1 mM, Na-EGTA 1 mM, $MgCl_2$ 2 mM, KCl 5 mM, HEPES 25 mM; pH 7,5] suplementado no dia da análise com PMSF 100 μ M, DTT 2 mM, Triton X-100 0,1% (v/v) e mistura anti-proteases 1:100. A suspensão homogénea resultante permaneceu em repouso e em gelo durante aproximadamente 30 minutos. O homogeneizado foi então centrifugado a 13000 rpm, durante 10 minutos e a 4°C. Do sobrenadante foi recolhida uma alíquota para determinação do conteúdo proteico, tendo o restante sido preservado de imediato até determinação da actividade da caspase a -80°C.

A actividade da caspase 3 foi avaliada por metodologia colorimétrica em leitor de placas de acordo com o método descrito por Dinis-Oliveira e colaboradores (2007). Para esse efeito, as amostras foram diluídas em tampão de ensaio [sacarose 10% (m/v), CHAPS 0,1% (m/v), HEPES 25 mM; pH 7,4] suplementado no momento da quantificação com DTT 10 mM. Para um volume máximo de 200 μ L por poço foram adicionados tampão de ensaio suplementado, amostra e, por fim, substrato colorimétrico, acetil-Asp-Glu-Val-Asl-p-nitroanilina (AC-DEVD-pN) 40 μ M, para se iniciar a reacção. Após um período de incubação de 120 minutos, na ausência de luz e a 37°C procedeu-se à leitura da densidade óptica a 405 nm para medição da clivagem do substrato. Os resultados encontram-se expressos em densidade óptica por g de proteína.

2.2.7. Factor de transcrição NF- κ B

Os sedimentos anteriormente obtidos (ver ponto 2.2.4.) foram ressuspensos em tampão AC e incubados em gelo durante 15 minutos. Terminada a incubação efectuou-se a centrifugação das amostras a 13000 rpm, a 4°C e durante 1 minuto. O sobrenadante foi rejeitado e o sedimento foi ressuspendido em tampão de lise nuclear BC [HEPES 20 mM, NaCl 420 mM, $MgCl_2$ 1,5 mM, EDTA 0,5 mM e glicerol 20% (v/v); pH 7,9] suplementado, no momento da utilização, com de DTT 1 mM, PMSF 0,25 mM, 5 μ g de aprotinina, 5 μ g de pepstatina e 5 μ g de leupeptina. As amostras foram vortexadas, incubadas em gelo durante 30 minutos e finalmente centrifugadas a 4°C, durante 20 minutos a 13000 rpm. Os sobrenadantes (extractos nucleares) foram recolhidos, aliquotados e armazenados a -80°C até a sua quantificação.

A avaliação das subunidades p50 e p65 do NF- κ B foi efectuada através de um kit comercial (Upsate, Califórnia, EUA) que combina o princípio do *electrophoretic mobility shift assay* (EMSA) com o do ELISA em placas de 96 poços, permitindo a análise de

maior número de amostras em simultâneo e sensibilidade aumentada comparativamente aos ensaios de EMSA convencionais. Resumidamente, após a preparação das soluções necessárias de acordo com o estabelecido pelo fabricante, foram adicionados, sequencialmente, os seguintes reagentes e/ou amostra à placa revestida com estreptavidina: tampão de ensaio, sonda de captura (sonda oligonucleotídica de cadeia dupla biotinilada com a sequência consenso do NF- κ B: 5'-GGGACTTTCC-3'), oligonucleótido competidor específico (oligonucleótido não biotinilado com a mesma sequência consenso do NF- κ B: 5'-GGGACTTTCC-3'), controlo negativo (sonda oligonucleotídica de cadeia dupla biotinilada que não possui a sequência consenso do NF- κ B), controlo positivo (extracto total de células HeLa tratadas com factor de necrose tumoral α) e extracto nuclear experimental. A placa permaneceu em incubação durante 120 minutos com agitação de 100 rpm e à temperatura ambiente. Finda a incubação, procedeu-se à lavagem dos poços e, de seguida, foi adicionado anticorpo primário anti-NF- κ B p50 ou p65, consoante a subunidade em análise, na diluição de 1:1000. O período de incubação foi de 60 minutos com agitação de 100 rpm e à temperatura ambiente, após o qual se efectuou novamente um passo de lavagem. Seguidamente, adicionou-se o anticorpo secundário conjugado com HRP na diluição de 1:500. Seguiu-se uma incubação de 30 minutos com agitação de 100 rpm à temperatura ambiente, período durante o qual se colocou o substrato cromogénico TMB a incubar a 37°C para aumentar a sensibilidade do ensaio. Após um novo passo de lavagem, adicionou-se o substrato pré-aquecido e permitiu-se a sua incubação durante 10 minutos a 37°C e na ausência de luz, monitorizando o desenvolvimento da coloração. Findo este período, adicionou-se HCl 0,5 M e efectuou-se a leitura da OD a 2 comprimentos de onda distintos, 450 nm como sendo o comprimento de onda de leitura e 650 nm como sendo o comprimento de onda de referência. Os resultados apresentam-se expressos em densidade óptica por g de proteína para ambas as subunidades.

3. REAGENTES

Todos os reagentes utilizados na execução deste trabalho possuíam grau analítico tendo sido adquiridos à Sigma-Aldrich Química, S.A. (Sintra, Portugal) e à Merck, S.A. (Lisboa, Portugal). A proveniência de todos os kits utilizados no estudo encontra-se mencionada no procedimento experimental.

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados estão expressos sob a forma de média $\pm$ desvio padrão.

A análise estatística do peso corporal, da ingestão sólida e da ingestão líquida foi efectuada através da análise de variância (ANOVA) com medidas repetidas utilizando o tratamento e o período experimental como variáveis independentes.

Para analisar a alcoolémia foi utilizada ANOVA de um factor com o período do dia como variável independente.

Para análise dos restantes dados foi aplicada ANOVA com dois factores com o tratamento e a administração de estradiol como variáveis independentes.

Sempre que se verificou significância pela ANOVA foram efectuadas comparações emparelhadas pelo teste de Tukey *Honest Significant Difference* (HSD).

As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$.

RESULTADOS

Os resultados a seguir apresentados demonstraram que os tratamentos a que as fêmeas da estirpe Wistar foram submetidas exerceram efeito significativo na maioria dos parâmetros avaliados.

A alcoolização crónica induziu aumento dos danos oxidativos sobre os lípidos, diminuição da protecção celular conferida pela glutathione, promoveu a morte celular por apoptose e aumentou a condição inflamatória traduzida pelo factor de transcrição NF- κ B. Apesar da abstinência alcoólica ser descrita como benéfica verificou-se que esta condição é capaz tanto de atenuar como de agravar os efeitos perniciosos decorrentes da ingestão crónica de etanol.

Observou-se ainda existir marcada influência dos estrogénios sobre vários dos parâmetros analisados, sendo de realçar que a administração de estradiol induziu modulação, tanto positiva como negativa, sobre os mesmos.

1. ANIMAIS E DIETAS

1.1. EVOLUÇÃO DO PESO CORPORAL

A ANOVA revelou efeito significativo do tratamento ($F_{2,72} = 320,67$; $p < 0,001$), do período experimental ($F_{6,72} = 181,42$; $p < 0,001$) e da interação tratamento $\times$ período experimental ($F_{12,72} = 10,140$; $p < 0,001$) sobre o peso corporal das fêmeas (Figura 2).

A evolução do peso corporal foi semelhante nas fêmeas do grupo de alcoolização e nas do grupo de controlo nutricional. O aumento do peso corporal dos animais destes grupos foi significativamente menor que nos do grupo de controlo puro ao longo de todo o período experimental. Observou-se ainda aumento do peso corporal nas fêmeas abstinentes comparativamente ao verificado no final do período de alcoolização.

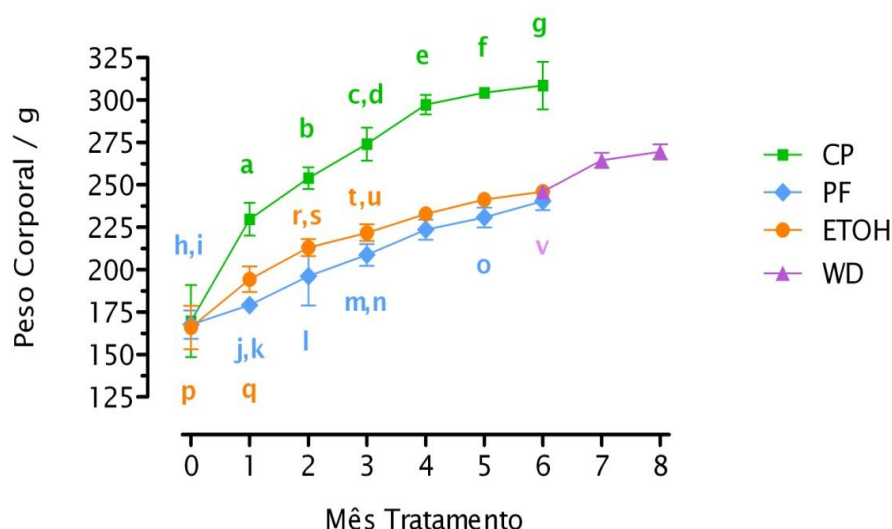


Figura 2. Evolução do peso corporal ao longo do período experimental. Os símbolos representam os valores médios do peso corporal (expressos em g) e as barras verticais o respectivo desvio padrão ($n=10$ para cada tratamento). CP: grupo controlo puro, PF: grupo controlo nutricional, ETOH: grupo alcoolização crónica, WD: grupo abstinência alcoólica. **a**, vs CP M0, CP M3, CP M4, CP M5, CP M6, PF M1, ETOH M1, $p < 0,001$; **b**, vs CP M0, CP M4, CP M5, CP M6, PF M2, ETOH M2, $p < 0,001$; **c**, vs CP M5, CP M6, $p < 0,01$; **d**, vs CP M0, PF M3, ETOH M3, $p < 0,001$; **e**, vs CP M0, PF M4, ETOH M4, $p < 0,001$; **f**, vs CP M0, PF M5, ETOH M5, $p < 0,001$; **g**, vs CP M0, PF M6, ETOH M6, $p < 0,001$; **h**, vs PF M2, $p < 0,01$; **i**, vs PF M3, PF M4, PF M5, PF M6, $p < 0,001$; **j**, vs ETOH M1, $p < 0,05$; **k**, vs PF M3, PF M4, PF M5, PF M6, $p < 0,001$; **l**, vs PF M4, PF M5, PF M6, $p < 0,001$; **m**, vs ETOH M3, $p < 0,05$; **n**, vs PF M6, $p < 0,001$; **o**, vs PF M3, ETOH M5, $p < 0,01$; **p**, vs ETOH M4, ETOH M5, ETOH M6, $p < 0,001$; **q**, vs ETOH M0, ETOH M3, ETOH M4, ETOH M5, ETOH M6, $p < 0,001$; **r**, vs ETOH M1, ETOH M4, $p < 0,01$; **s**, vs ETOH M0, ETOH M5, ETOH M6, $p < 0,001$; **t**, vs ETOH M5, $p < 0,01$; **u**, vs ETOH M0, ETOH M6, $p < 0,001$; **v**, vs WD M7, WD M8, $p < 0,001$.

1.2. INGESTÃO DE DIETA SÓLIDA

A ingestão sólida das fêmeas (Figura 3) foi significativamente influenciada pelo tratamento ($F_{2,72}=248,54$; $p<0,001$), pelo período experimental ($F_{6,72}=7,7072$; $p<0,001$) e pela interacção tratamento $\times$ período experimental ($F_{12,72}=8,1254$; $p<0,001$).

As fêmeas alcoolizadas ingeriram significativamente menor quantidade de dieta sólida que as fêmeas dos grupos de controlo ao longo de todo o período experimental, sendo esta diferença particularmente evidente durante o primeiro mês de tratamento. Presenciou-se ainda aumento da ingestão sólida pelas fêmeas abstinentes para valores semelhantes aos observados nas fêmeas do grupo de controlo puro.

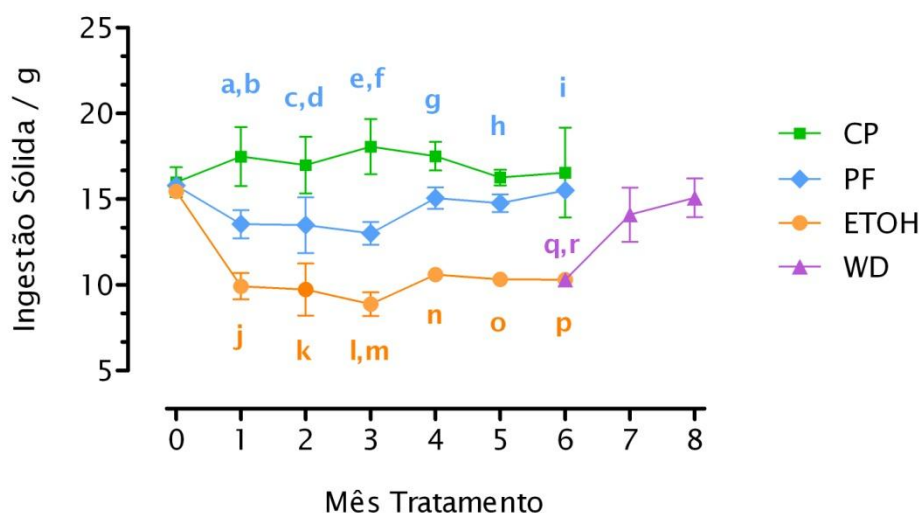


Figura 3. Ingestão de dieta sólida ao longo do período experimental. Os símbolos representam os valores médios da ingestão de dieta sólida (expressos em g) e as barras verticais o respectivo desvio padrão ($n=10$ para cada tratamento). CP: grupo controlo puro, PF: grupo controlo nutricional, ETOH: grupo alcoolização crónica, WD: grupo abstinência alcoólica. **a**, vs PF M0, PF M6, $p<0,05$; **b**, vs CP M1, ETOH M1, $p<0,01$; **c**, vs CP M2, PF M6, $p<0,05$; **d**, vs PF M0, ETOH M2, $p<0,01$; **e**, vs PF M4, PF M5, $p<0,05$; **f**, vs CP M3, PF M0, ETOH M3, $p<0,001$; **g**, vs CP M4, ETOH M4, $p<0,001$; **h**, vs CP M5, ETOH M5, $p<0,001$; **i**, vs, PF M3, ETOH M6, $p<0,01$; **j**, vs CP M1, ETOH M0, $p<0,001$; **k**, vs CP M2, ETOH M0, $p<0,001$; **l**, vs ETOH M4, $p<0,05$; **m**, vs CP M3, ETOH M0, $p<0,001$; **n**, vs CP M4, ETOH M0, $p<0,001$; **o**, vs CP M5, ETOH M0, $p<0,001$; **p**, vs CP M6, ETOH M0, $p<0,001$; **q**, vs WD M7, $p<0,01$; **r**, vs WD M8, $p<0,001$.

1.3. INGESTÃO DE LÍQUIDOS

As diferenças observadas na ingestão líquida variaram significativamente em função do tratamento ($F_{2,72} = 280,31$; $p < 0,001$), do período experimental ($F_{6,72} = 5,8003$; $p < 0,001$) e da interacção tratamento $\times$ período experimental ($F_{12,72} = 14,116$; $p < 0,001$) (Figura 4).

Observou-se que o volume de dieta líquida ingerida pelas fêmeas do grupo de alcoolização foi significativamente menor que o ingerido pelas fêmeas dos grupos de controlo, sendo esta diferença especialmente notória durante o primeiro mês de tratamento. Após o fim do 1º mês de tratamento, o volume da dieta líquida ingerida pelas fêmeas alcoolizadas manteve-se relativamente constante ao longo do período experimental. Pelo contrário, nas fêmeas do grupo de controlo puro o volume de água ingerido aumentou progressivamente até aos 6 meses de idade (4º mês do período experimental) tendo posteriormente decaído significativamente até ao 8º mês (6º mês de tratamento). Nas fêmeas do grupo de controlo nutricional a ingestão líquida foi relativamente constante durante os 2 primeiros meses de tratamento, tendo ulteriormente diminuído lenta mas significativamente até ao fim do período experimental. Verificou-se ainda aumento significativo da ingestão líquida pelas fêmeas abstinentes durante o 1º mês de privação alcoólica.

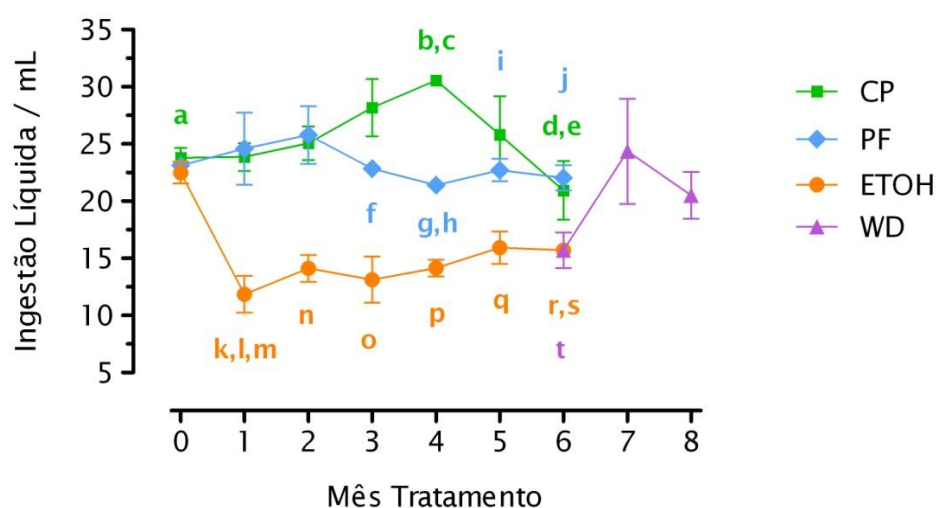


Figura 4. Ingestão de líquidos ao longo do período experimental. Os símbolos representam os valores médios da ingestão líquida (expressos em mL) e as barras verticais o respectivo desvio padrão ($n=10$ para cada tratamento). CP: grupo controlo puro, PF: grupo controlo nutricional, ETOH: grupo alcoolização crónica, WD: grupo abstinência alcoólica. **a**, vs CP M3, $p < 0,05$; **b**, vs CP M2, CP M5, $p < 0,05$; **c**, vs CP M0, CP M1, $p < 0,01$; **d**, vs CP M5, $p < 0,05$; **e**, vs CP M3, CP M4, $p < 0,001$; **f**, vs CP M3, $p < 0,01$; **g**, vs PF M2, $p < 0,01$; **h**, vs CP M4, $p < 0,001$; **i**, vs ETOH M5, $p < 0,01$; **j**, vs PF M2, $p < 0,05$; **k**, vs ETOH M6, $p < 0,05$; **l**, vs ETOH M5, $p < 0,01$; **m**, vs CP M1, PF M1, ETOH M0, $p < 0,001$; **n**, vs CP M2, PF M2, ETOH M0, $p < 0,001$; **o**, vs CP M3, PF M3, ETOH M0, $p < 0,001$; **p**, vs CP M4, PF M4, ETOH M0, $p < 0,001$; **q**, vs CP M5, ETOH M0, $p < 0,001$; **r**, vs CP M6, PF M6, $p < 0,01$; **s**, vs ETOH M0, $p < 0,001$; **t**, vs WD M7, $p < 0,01$.

1.4. INGESTÃO CALÓRICA

Na Tabela 1 apresentam-se os resultados relativos à ingestão calórica das fêmeas dos diferentes grupos experimentais. A ANOVA demonstrou haver influência significativa do tratamento ($F_{2,72} = 52,064$; $p < 0,001$), do período experimental ($F_{6,72} = 2,5589$; $p < 0,05$) e da interacção tratamento $\times$ período experimental ($F_{12,72} = 3,4958$; $p < 0,001$).

Ao longo de todo o período experimental, a quantidade de calorias ingeridas foi semelhante para as fêmeas alcoolizadas e para as do grupo de controlo nutricional e, em ambos os grupos, significativamente inferior à observada no grupo de controlo puro.

Tabela 1. Ingestão calórica ao longo do período experimental. Os valores encontram-se expressos em Kcal/mês/animal e estão apresentados sob a forma de média $\pm$ desvio padrão ($n=10$ para cada tratamento).

Período tratamento	Controlo puro	Controlo nutricional	Alcoolização crónica	Abstinência alcoólica
M0	59,77 $\pm$ 3,25	59,06 $\pm$ 1,34 ^{g,h}	57,81 $\pm$ 1,51 ^m	57,81 $\pm$ 1,51
M1	65,44 $\pm$ 6,44 ^a	50,63 $\pm$ 3,08 ⁱ	50,22 $\pm$ 4,65	—
M2	63,55 $\pm$ 6,16 ^b	50,43 $\pm$ 6,08 ^j	51,99 $\pm$ 6,54	—
M3	67,58 $\pm$ 6,03 ^c	48,66 $\pm$ 2,48 ^{k,l}	47,72 $\pm$ 3,52 ⁿ	—
M4	65,48 $\pm$ 3,12 ^d	56,35 $\pm$ 2,37	55,28 $\pm$ 1,13	—
M5	60,81 $\pm$ 1,68 ^{e,f}	55,21 $\pm$ 1,94	56,24 $\pm$ 2,81	—
M6	61,92 $\pm$ 9,80	57,98 $\pm$ 0,49	55,91 $\pm$ 1,46	55,91 $\pm$ 1,46
M7	—	—	—	52,72 $\pm$ 5,92
M8	—	—	—	56,42 $\pm$ 4,25

a, vs PF M1, ETOH M1, $p < 0,01$; **b**, vs PF M2, ETOH M2, $p < 0,05$; **c**, vs PF M3, ETOH M3, $p < 0,001$; **d**, vs PF M4, ETOH M4, $p < 0,001$; **e**, vs ETOH M5, $p < 0,05$; **f**, vs PF M5, $p < 0,01$; **g**, vs PF M2, $p < 0,01$; **h**, vs PF M3, $p < 0,001$; **i**, vs PF M0, PF M6, $p < 0,05$; **j**, vs PF M6, $p < 0,05$; **k**, vs PF M4, PF M5, $p < 0,05$; **l**, vs PF M6, $p < 0,01$; **m**, vs ETOH M3, $p < 0,01$; **n**, vs ETOH M5, ETOH M6, $p < 0,05$.

2. PESOS HEPÁTICO E UTERINO

2.1. FÍGADO

O peso relativo do fígado (Tabela 2) variou significativamente em função do tratamento ($F_{3,32}=13,632$; $p<0,001$), da administração de estradiol ($F_{1,32}=11,935$; $p<0,01$) e da interacção tratamento $\times$ administração de estradiol ($F_{3,32}=2,9197$; $p<0,05$).

Observou-se que o peso relativo do fígado era significativamente menor nas fêmeas do grupo de controlo nutricional que nos animais dos restantes grupos experimentais. Verificou-se ainda que, com excepção das fêmeas do grupo de controlo nutricional, a administração de estrogénio resultou na diminuição significativa do peso relativo do fígado.

2.2. ÚTERO

A ANOVA revelou efeito significativo do tratamento ($F_{3,32}=8,2704$; $p<0,001$), da administração de estradiol ($F_{1,32}=250,53$; $p<0,001$) e da interacção tratamento $\times$ administração de estradiol ($F_{3,32}=11,998$; $p<0,001$) sobre o peso uterino (Tabela 2).

Não se observaram diferenças significativas no peso uterino entre os animais dos grupos de controlo, alcoolização e abstinência. Verificou-se ainda, em todas as condições experimentais, que a administração de estradiol conduziu a um aumento significativo do peso uterino.

Tabela 2. Efeito do tratamento e da administração de estradiol no peso relativo do fígado e no peso uterino. Os valores encontram-se apresentados sob a forma de média $\pm$ desvio padrão ($n=5$ para cada terapia hormonal).

Tratamento	Terapia hormonal	Peso hepático relativo (g/Kg peso corporal)	Peso uterino absoluto (g)
Controlo puro	Veículo	$30,58 \pm 1,70^a$	$0,417 \pm 0,086$
	E ₂ -benzoato	$26,89 \pm 2,50^b$	$0,731 \pm 0,096^{f,g}$
Controlo nutricional	Veículo	$25,36 \pm 2,36^c$	$0,328 \pm 0,035^h$
	E ₂ -benzoato	$26,28 \pm 1,81$	$1,456 \pm 0,282$
Alcoolização crónica	Veículo	$32,55 \pm 1,76$	$0,341 \pm 0,073^i$
	E ₂ -benzoato	$29,92 \pm 1,25^d$	$1,366 \pm 0,269$
Abstinência alcoólica	Veículo	$29,98 \pm 2,41^e$	$0,453 \pm 0,158^j$
	E ₂ -benzoato	$27,10 \pm 0,50$	$1,296 \pm 0,136$

a, vs PF veículo, $p<0,01$; **b**, vs CP veículo, $p<0,05$; **c**, vs ETOH veículo, $p<0,001$; **d**, vs PF E₂-benzoato, ETOH veículo, $p<0,05$; **e**, vs PF veículo, WD E₂-benzoato, $p<0,05$; **f**, vs ETOH E₂-benzoato, WD E₂-benzoato, $p<0,05$; **g**, vs CP veículo, PF E₂-benzoato, $p<0,001$; **h**, vs PF E₂-benzoato, $p<0,001$; **i**, vs ETOH E₂-benzoato, $p<0,001$; **j**, vs WD E₂-benzoato, $p<0,001$.

3. SORO

3.1. ALCOOLÉMIA

Na Figura 5 representam-se graficamente os valores médios do nível de etanol presente no soro dos animais submetidos a ingestão alcoólica. O teor de etanol atingiu valores mensuráveis tanto às 10 como às 22 horas sendo, no entanto, significativamente mais elevado às 22 horas.

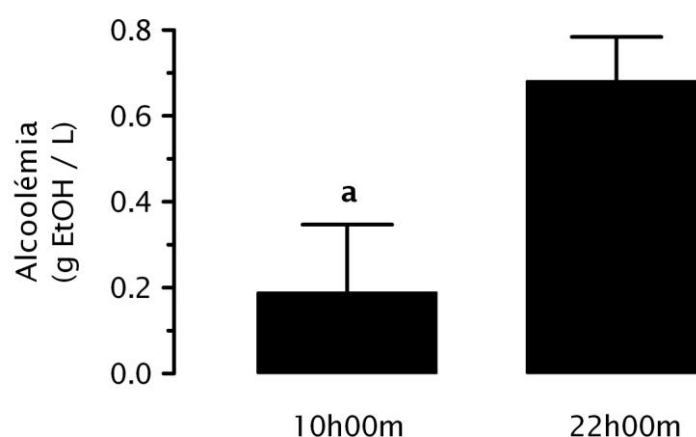


Figura 5. Alcoolémia. As colunas representam os valores médios de alcoolémia (expressos em g/L) às 10h e às 22h e as barras verticais representam os respectivos desvios padrão (n=12 para cada hora analisada). **a**, vs 22h00m, $p < 0,001$.

3.2. HORMONAS

3.2.1. Corticosterona

Os níveis de corticosterona no soro (Tabela 3) variaram significativamente em função do tratamento ($F_{3,32} = 12,361$; $p < 0,001$) e da administração de estradiol ($F_{1,32} = 21,803$; $p < 0,001$); no entanto, não se verificou existir interacção significativa entre estes dois factores ($F_{3,32} = 2,5655$; $p > 0,05$).

Somente nas fêmeas do grupo de controlo nutricional se observou aumento dos níveis circulantes de corticosterona. Salienta-se ainda que a administração de estradiol conduziu ao aumento da concentração de corticosterona apenas nas fêmeas abstinentes e nas fêmeas do grupo de controlo puro.

3.2.2. 17- β -Estradiol

A ANOVA revelou efeito significativo do tratamento ($F_{3,32} = 14,720$; $p < 0,001$), da administração de estradiol ($F_{1,32} = 36,860$; $p < 0,001$) e da interação tratamento $\times$ administração de estradiol ($F_{3,32} = 11,016$; $p < 0,001$) sobre os níveis séricos de 17- β -estradiol (Tabela 3).

Como seria de esperar, a administração de estradiol resultou no aumento dos níveis séricos de estrogénios em todos os grupos experimentais.

3.2.3. Progesterona

Relativamente aos níveis de progesterona (Tabela 3) não se observou variação significativa em função do tratamento ($F_{3,32} = 0,9142$; $p > 0,05$) nem interação tratamento $\times$ administração de estradiol ($F_{3,32} = 0,7293$; $p > 0,05$). Todavia, verificou-se que a administração de estradiol exerceu uma influência significativa ($F_{1,32} = 11,451$; $p < 0,01$) sobre este parâmetro.

O aumento dos níveis séricos de progesterona, após administração de estradiol, apenas foi significativo nos animais submetidos a abstinência alcoólica..

Tabela 3. Efeito do tratamento e da administração de estradiol nos níveis séricos de corticosterona, estradiol e progesterona. Os valores encontram-se apresentados sob a forma de média $\pm$ desvio padrão ($n=5$ para cada terapia hormonal).

Tratamento	Terapia hormonal	Corticosterona (ng/mL)	17- β -Estradiol (pg/mL)	Progesterona (ng/mL)
Controlo puro	Veículo	50,02 $\pm$ 6,84 ^{a,b}	115,96 $\pm$ 82,27 ^b	5,46 $\pm$ 2,17
	E ₂ -benzoato	64,27 $\pm$ 4,55	1124,6 $\pm$ 539,0 ^g	14,20 $\pm$ 9,80
Controlo nutricional	Veículo	62,13 $\pm$ 5,17 ^c	51,520 $\pm$ 19,01 ^h	5,06 $\pm$ 3,01
	E ₂ -benzoato	67,30 $\pm$ 2,76 ^d	226,00 $\pm$ 71,12	7,40 $\pm$ 6,45
Alcoolização crónica	Veículo	53,04 $\pm$ 4,18	63,900 $\pm$ 37,62 ⁱ	6,68 $\pm$ 3,03
	E ₂ -benzoato	55,20 $\pm$ 3,20 ^e	209,20 $\pm$ 94,28	11,00 $\pm$ 4,64
Abstinência alcoólica	Veículo	42,32 $\pm$ 9,28 ^f	34,980 $\pm$ 15,42 ^j	5,68 $\pm$ 4,64 ^f
	E ₂ -benzoato	55,66 $\pm$ 8,00	236,20 $\pm$ 64,55	12,44 $\pm$ 3,28

^a, vs PF veículo, $p < 0,05$; ^b, vs CP E₂-benzoato, $p < 0,01$; ^c, vs WD veículo, $p < 0,01$; ^d, vs WD E₂-benzoato, $p < 0,05$; ^e, vs PF E₂-benzoato, $p < 0,01$; ^f, vs WD E₂-benzoato, $p < 0,05$; ^g, vs PF E₂-benzoato, ETOH E₂-benzoato, WD E₂-benzoato, $p < 0,001$; ^h, vs PF E₂-benzoato, $p < 0,001$; ⁱ, vs ETOH E₂-benzoato, $p < 0,05$; ^j, vs WD E₂-benzoato, $p < 0,001$.

4. FÍGADO

4.1. PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

A ANOVA revelou efeito do tratamento ($F_{3,32} = 38,788$; $p < 0,001$), da administração de estradiol ($F_{1,32} = 73,117$; $p < 0,001$) e da interação tratamento $\times$ administração de estradiol ($F_{3,32} = 2,9614$; $p < 0,05$) sobre a degradação oxidativa dos lípidos (Figura 6).

Os níveis de MDA eram significativamente maiores nas fêmeas alcoolizadas e nas abstinentes que nas dos grupos de controlo, sendo de realçar que as fêmeas abstinentes apresentaram níveis superiores aos observados nas fêmeas alcoolizadas. Verificou-se ainda que, em todas as condições experimentais, os níveis de MDA aumentaram significativamente após administração de estradiol.

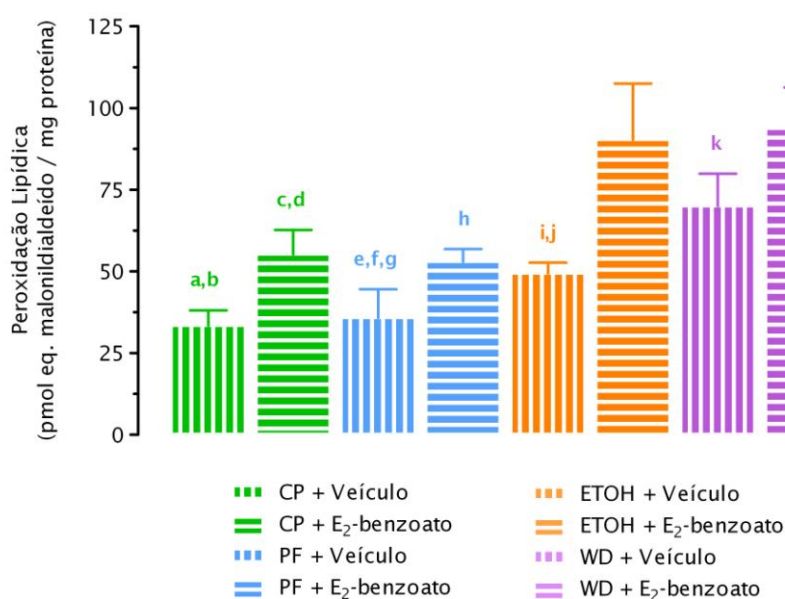


Figura 6. Efeito do tratamento e da administração de estradiol na peroxidação lipídica. As colunas representam os valores médios de equivalentes de MDA e as barras verticais representam os respectivos desvios padrão ($n=5$ para cada terapia hormonal). CP: grupo controlo puro, PF: grupo controlo nutricional, ETOH: grupo alcoolização crónica, WD: grupo abstinência alcoólica. **a**, vs ETOH veículo, $p < 0,05$; **b**, vs CP E₂-benzoato, WD veículo, $p < 0,001$; **c**, vs ETOH E₂-benzoato, $p < 0,01$; **d**, vs WD E₂-benzoato, $p < 0,001$; **e**, vs ETOH veículo, $p < 0,05$; **f**, vs PF E₂-benzoato, $p < 0,01$; **g**, vs WD veículo, $p < 0,001$; **h**, vs ETOH E₂-benzoato, WD E₂-benzoato, $p < 0,001$; **i**, vs WD veículo, $p < 0,01$; **j**, vs ETOH E₂-benzoato, $p < 0,001$; **k**, vs WD E₂-benzoato, $p < 0,05$.

4.2. GRUPOS CARBONILO

A formação de grupos carbonilo (ver Figura 7) foi influenciada significativamente pelo tratamento ($F_{3,32} = 17,193$; $p < 0,001$) mas não pela administração de estradiol ($F_{1,32} = 0,0101$; $p > 0,05$). Também não se observou interacção significativa tratamento $\times$ administração de estradiol ($F_{3,32} = 0,5882$; $p > 0,05$).

O nível de grupos carbonilo não diferiu entre os grupos de controlo puro, alcoolização e abstinência sendo, no entanto, significativamente maior no grupo de controlo nutricional. Não se observou, em todas as condições experimentais, variação do nível de grupos carbonilo em resposta à administração de estradiol.

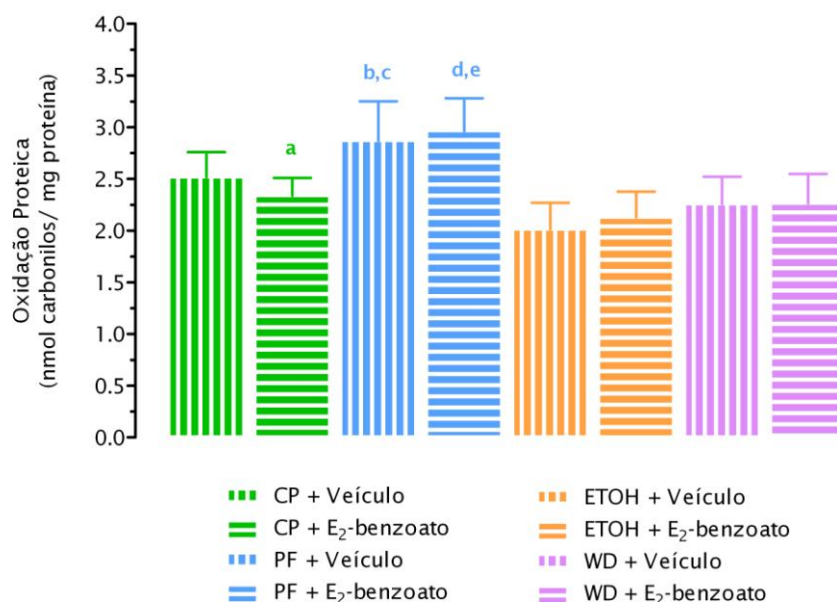


Figura 7. Efeito do tratamento e da administração de estradiol no nível de grupos carbonilo. As colunas representam os valores médios de grupos carbonilo e as barras verticais representam os respectivos desvios padrão ($n=5$ para cada terapia hormonal). CP: grupo controlo puro, PF: grupo controlo nutricional, ETOH: grupo alcoolização crónica, WD: grupo abstinência alcoólica. **a**, vs PF E₂-benzoato, $p < 0,01$; **b**, vs WD veículo, $p < 0,05$; **c**, vs ETOH veículo, $p < 0,01$; **d**, vs WD E₂-benzoato, $p < 0,01$; **e**, vs ETOH E₂-benzoato, $p < 0,001$.

4.3. GLUTATIONA

4.3.1. Glutathiona reduzida

A ANOVA revelou efeito significativo do tratamento ($F_{3,32}=20,274$; $p<0,001$) e da administração de estradiol ($F_{1,32}=6,3297$; $p<0,05$) sobre o teor de glutathiona reduzida. Verificou-se ainda interacção tratamento $\times$ administração de estradiol significativa ($F_{3,32}=16,296$; $p<0,001$) (Tabela 4).

A concentração de GSH era significativamente menor nos animais alcoolizados e nos abstinentes do que nos grupos de controlo. Verificou-se ainda que os níveis de GSH sofreram alteração após administração de estradiol apenas nos grupos de controlo.

4.3.2. Glutathiona oxidada

Como se mostra na Tabela 4, a concentração de GSSG variou significativamente em função do tratamento ($F_{3,32}=6,2731$; $p<0,01$), da administração de estradiol ($F_{1,32}=16,771$; $p<0,001$) e da interacção tratamento $\times$ administração de estradiol ($F_{3,32}=8,6097$; $p<0,001$).

Verificou-se que o nível de GSSG era significativamente superior nas fêmeas dos grupos de alcoolização crónica, abstinência e controlo nutricional comparativamente ao das fêmeas do grupo de controlo puro. Observou-se também que a terapia hormonal levou à diminuição da concentração de GSSG nas fêmeas abstinentes tendo, no entanto, aumentado a concentração de GSSG nas restantes condições experimentais.

4.3.3. Glutathiona reduzida / Glutathiona oxidada

Relativamente à razão GSH/GSSG, a ANOVA demonstrou existir influência do tratamento ($F_{3,32}=14,983$; $p<0,001$), da administração de estradiol ($F_{1,32}=7,5130$; $p<0,01$) e da interacção tratamento $\times$ administração de estradiol ($F_{3,32}=17,368$; $p<0,001$) (Tabela 4).

O valor da razão GSH/GSSG era significativamente menor nos animais dos grupos de alcoolização e de abstinência do que nos do grupo de controlo puro. Curiosamente, nos animais do grupo de controlo nutricional esta razão era igualmente inferior à observada no grupo de controlo puro e não diferia significativamente da dos grupos de alcoolização e de abstinência. Verificou-se ainda que a administração de estradiol apenas induziu alteração da razão GSH/GSSG nos animais do grupo de controlo puro.

Tabela 4. Efeito do tratamento e da administração de estradiol nos níveis de glutatona. Os valores encontram-se apresentados sob a forma de média $\pm$ desvio padrão ($n=5$ para cada terapia hormonal)

Tratamento	Terapia hormonal	GSH (nmol/mg proteína)	GSSG (nmol/mg proteína)	GSH/GSSG
Controlo puro	Veículo	38,19 $\pm$ 4,27 ^a	0,412 $\pm$ 0,047 ^d	96,22 $\pm$ 19,40 ^k
	E ₂ -benzoato	30,64 $\pm$ 4,81 ^b	0,712 $\pm$ 0,070 ^e	45,43 $\pm$ 8,05
Controlo nutricional	Veículo	30,28 $\pm$ 3,32	0,629 $\pm$ 0,133	51,23 $\pm$ 7,32
	E ₂ -benzoato	51,84 $\pm$ 6,77 ^c	0,881 $\pm$ 0,199 ^f	63,15 $\pm$ 14,41 ^l
Alcoolização crónica	Veículo	26,81 $\pm$ 5,94	0,617 $\pm$ 0,117 ^g	46,07 $\pm$ 9,79
	E ₂ -benzoato	31,53 $\pm$ 5,64	0,782 $\pm$ 0,045 ^h	42,55 $\pm$ 8,08
Abstinência alcoólica	Veículo	25,90 $\pm$ 3,69	0,688 $\pm$ 0,085 ⁱ	39,90 $\pm$ 5,16
	E ₂ -benzoato	23,07 $\pm$ 4,60	0,537 $\pm$ 0,090 ^j	44,99 $\pm$ 5,95

a, vs ETOH veículo, WD veículo, $p<0,01$; **b**, vs CP veículo, $p<0,05$; **c**, vs CP E₂-benzoato, PF veículo, ETOH E₂-benzoato, WD E₂-benzoato, $p<0,001$; **d**, vs PF veículo, ETOH veículo, $p<0,05$; **e**, vs CP veículo, $p<0,001$; **f**, vs PF veículo, WD E₂-benzoato, $p<0,05$; **g**, vs ETOH E₂-benzoato, $p<0,05$; **h**, vs PF E₂-benzoato, $p<0,01$; **i**, vs CP veículo, $p<0,01$; **j**, vs WD veículo, $p<0,05$; **k**, vs CP E₂-benzoato, PF veículo, ETOH veículo, WD veículo, $p<0,001$; **l**, vs CP E₂-benzoato, ETOH E₂-benzoato, WD E₂-benzoato, $p<0,05$.

4.4. PROTEÍNA BCL-2

Relativamente à concentração de proteína Bcl-2 (Figura 8) não se verificou efeito do tratamento ($F_{3,32} = 0,9805$; $p > 0,05$) nem da administração de estradiol ($F_{1,32} = 1,6769$; $p > 0,05$). A ANOVA também não revelou influencia significativa da interacção entre estes dois factores ($F_{3,32} = 0,6822$; $p > 0,05$) sobre o nível desta proteína.

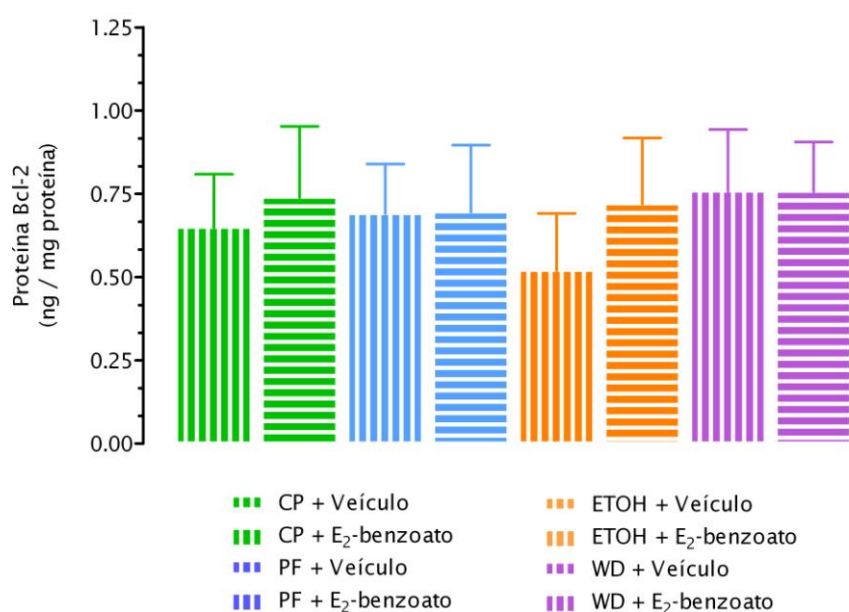


Figura 8. Efeito do tratamento e da administração de estradiol na concentração de proteína Bcl-2. As colunas representam os valores médios relativos à expressão da proteína Bcl-2 e as barras verticais representam os respectivos desvios padrão ($n=5$ para cada terapia hormonal). CP: grupo controlo puro, PF: grupo controlo nutricional, ETOH: grupo alcoolização crónica, WD: grupo abstinência alcoólica.

4.5. CITOCROMO C CITOSÓLICO

A concentração citosólica de cyt c (Figura 9) variou significativamente com o tratamento ($F_{3,32} = 9,8934$; $p < 0,001$) e com a administração de estradiol ($F_{1,32} = 5,9494$; $p < 0,05$), no entanto, a interacção tratamento $\times$ administração de estradiol não revelou influência significativa ($F_{3,32} = 0,6915$; $p > 0,05$).

O nível médio de cyt c citosólico era superior nas fêmeas alcoolizadas que nos restantes grupos experimentais, que apresentaram valores idênticos entre si. A terapia hormonal também não modificou os níveis de cyt c em nenhum dos grupos experimentais, excepto nas fêmeas abstinentes onde a sua administração conduziu à diminuição do nível citosólico de cyt c.

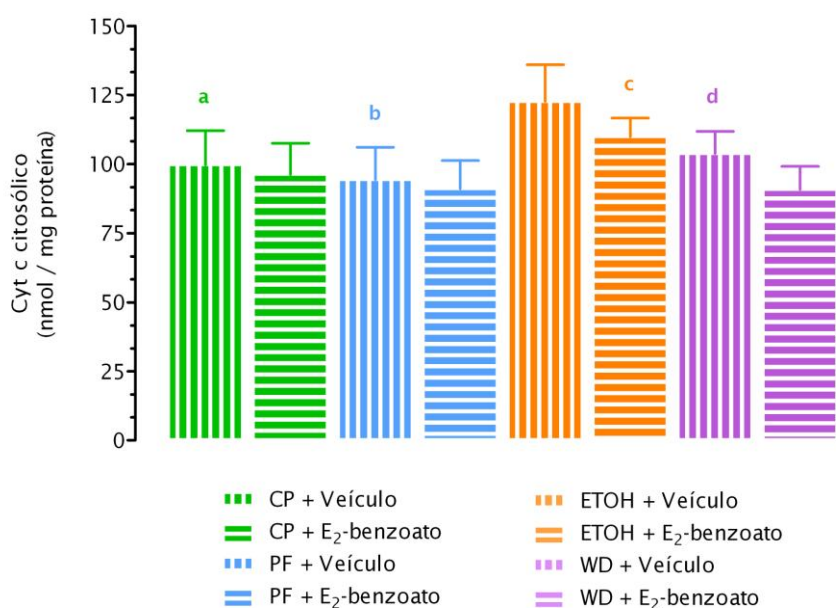


Figura 9. Efeito do tratamento e da administração de estradiol na concentração citosólica de cyt c. As colunas representam os valores médios de cyt c presente no citosol e as barras verticais representam os respectivos desvios padrão ($n=5$ para cada terapia hormonal). CP: grupo controlo puro, PF: grupo controlo nutricional, ETOH: grupo alcoolização crónica, WD: grupo abstinência alcoólica. **a**, vs ETOH veículo, $p < 0,05$; **b**, vs ETOH veículo, $p < 0,01$; **c**, vs PF E₂-benzoato, WD E₂-benzoato, $p < 0,05$; **d**, vs WD E₂-benzoato, $p < 0,05$.

4.6. CASPASE 3

A ANOVA revelou efeito do tratamento ($F_{3,32} = 27,979$; $p < 0,001$), da administração de estradiol ($F_{1,32} = 22,901$; $p < 0,001$) mas não da interacção tratamento $\times$ administração de estradiol ($F_{3,32} = 1,5868$; $p > 0,05$) sobre a actividade da caspase 3 (Figura 10).

A alcoolização crónica resultou no aumento da actividade da caspase 3 relativamente ao grupo de controlo nutricional, não tendo sido observada qualquer alteração comparativamente aos grupos de controlo puro e abstinência. Verificou-se ainda que a administração de estrogénio apenas induziu aumento significativo da actividade da caspase 3 nas fêmeas dos grupos de controlo nutricional e de alcoolização crónica, não tendo exercido qualquer efeito nas fêmeas do grupo de controlo puro e nas abstinentes.

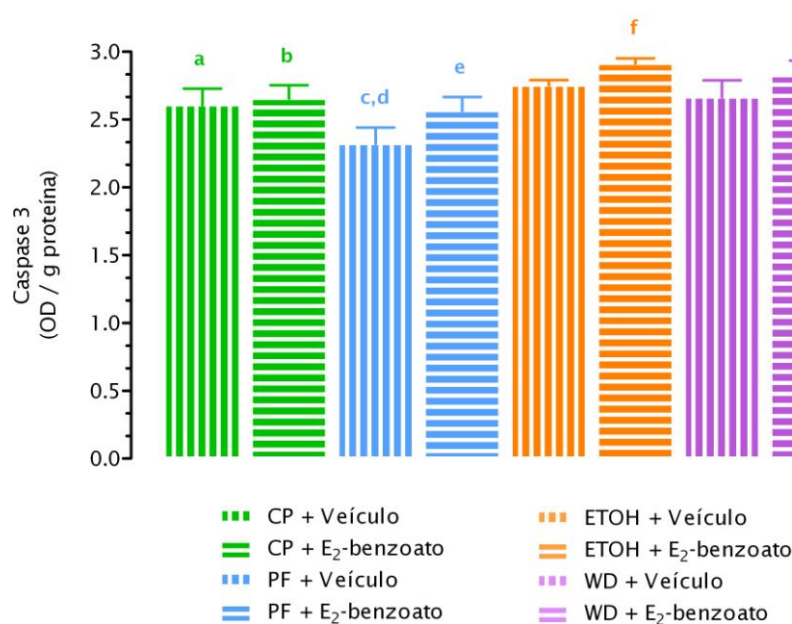


Figura 10. Efeito do tratamento e da administração de estradiol na actividade da caspase 3. As colunas representam os valores médios da caspase 3 e as barras verticais representam os respectivos desvios padrão ($n=5$ para cada terapia hormonal). CP: grupo controlo puro, PF: grupo controlo nutricional, ETOH: grupo alcoolização crónica, WD: grupo abstinência alcoólica. **a**, vs PF veículo, $p < 0,01$; **b**, vs ETOH E₂-benzoato, $p < 0,01$; **c**, vs PF E₂-benzoato, $p < 0,01$; **d**, vs ETOH veículo, WD veículo, $p < 0,001$; **e**, vs WD E₂-benzoato, $p < 0,01$; **f**, vs PF E₂-benzoato, ETOH veículo, $p < 0,001$.

4.7. FACTOR DE TRANSCRIÇÃO NF-KB

4.7.1. Subunidade p50

De acordo com o apresentado na Figura 11, a translocação da subunidade p50 foi influenciada significativamente pelo tratamento ($F_{3,32} = 164,81$; $p < 0,001$), pela administração de estradiol ($F_{1,32} = 281,81$; $p < 0,001$) e pela interação tratamento $\times$ administração de estradiol ($F_{3,32} = 5,7383$; $p < 0,01$).

Verificou-se que a translocação nuclear da subunidade p50, em condições de alcoolização prolongada, duplicou comparativamente ao grupo de controlo puro e quadruplicou relativamente ao grupo de controlo nutricional. Observou-se também que a abstinência alcoólica diminuiu significativamente a translocação nuclear desta subunidade para valores idênticos aos do grupo de controlo puro. Presenciou-se ainda, em todos os grupos experimentais, aumento significativo da translocação nuclear da subunidade p50 após administração de estradiol.

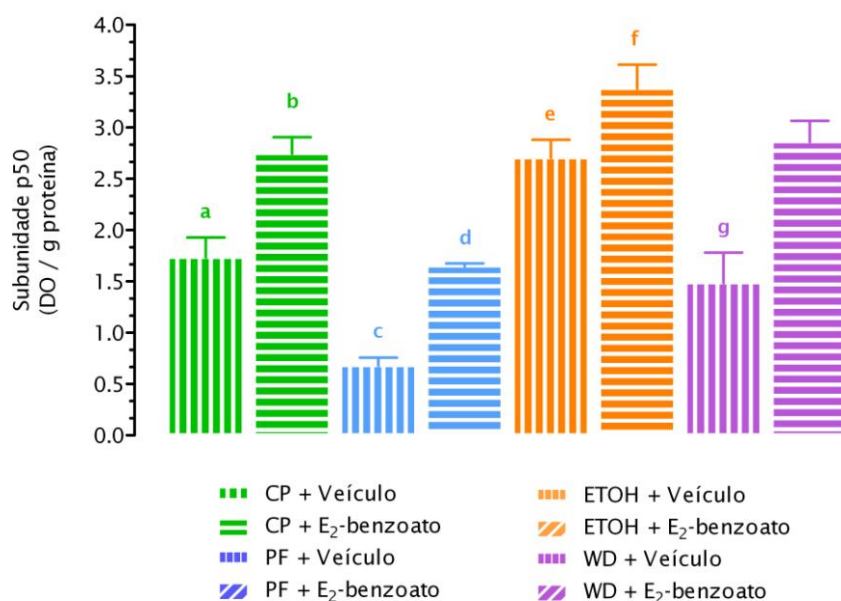


Figura 11. Efeito do tratamento e da administração de estradiol na translocação nuclear da subunidade p50 do NF- κ B. As colunas representam os valores médios relativos à translocação da subunidade p50 e as barras verticais representam os respectivos desvios padrão ($n=5$ para cada terapia hormonal). CP: grupo controlo puro, PF: grupo controlo nutricional, ETOH: grupo alcoolização crónica, WD: grupo abstinência alcoólica. **a**, vs CP E₂-benzoato, PF veículo, ETOH veículo, $p < 0,001$; **b**, vs PF E₂-benzoato, ETOH E₂-benzoato, $p < 0,001$; **c**, vs PF E₂-benzoato, ETOH veículo, WD veículo, $p < 0,001$; **d**, vs ETOH E₂-benzoato, WD E₂-benzoato, $p < 0,001$; **e**, vs WD veículo, $p < 0,001$; **f**, vs ETOH veículo, WD E₂-benzoato, $p < 0,01$; **g**, vs WD E₂-benzoato, $p < 0,001$.

4.7.2. Subunidade p65

A ANOVA mostrou efeito significativo do tratamento ($F_{3,32}=74,240$; $p<0,001$), da administração de estradiol ($F_{1,32}=152,07$; $p<0,001$) e da interação tratamento $\times$ administração de estradiol ($F_{3,32}=3,0119$; $p<0,05$) sobre a translocação da subunidade p65 (Figura 12).

A alcoolização crónica levou a um aumento da translocação nuclear da subunidade p65 de 155% relativamente ao grupo de controlo puro e de 224% comparativamente ao grupo de controlo nutricional. Após abstinência, a translocação nuclear desta subunidade desceu significativamente em relação ao observado nos animais alcoolizados, não diferindo do grupo de controlo puro. Verificou-se ainda que a administração de estradiol resultou no aumento da translocação nuclear desta subunidade em todas as condições experimentais.

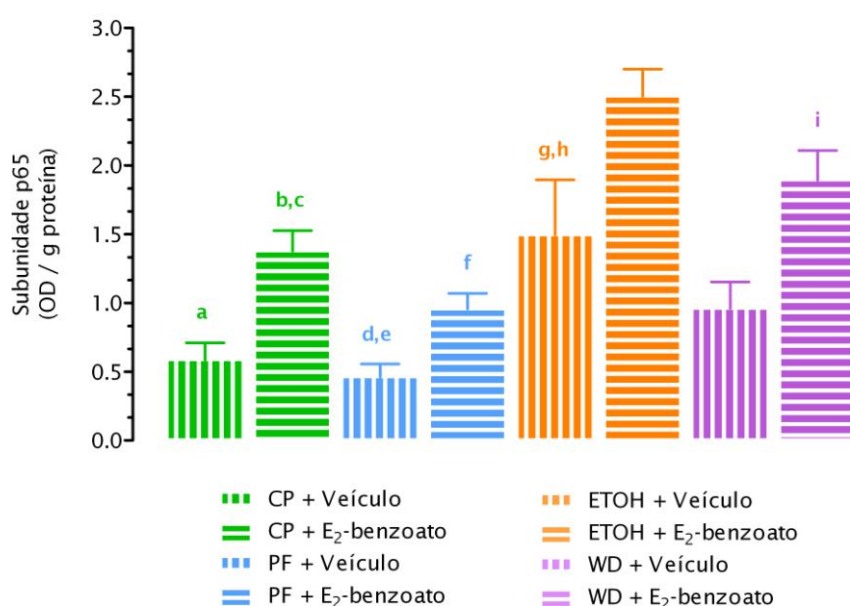


Figura 12. Efeito do tratamento e da administração de estradiol na translocação nuclear da subunidade p65 do NF- κ B. As colunas representam os valores médios relativos à translocação da subunidade p65 e as barras verticais representam os respectivos desvios padrão ($n=5$ para cada terapia hormonal). CP: grupo controlo puro, PF: grupo controlo nutricional, ETOH: grupo alcoolização crónica, WD: grupo abstinência alcoólica. **a**, vs CP E₂-benzoato, ETOH veículo, $p<0,001$; **b**, vs PF E₂-benzoato, WD E₂-benzoato, $p<0,01$; **c**, vs ETOH E₂-benzoato, $p<0,001$; **d**, vs WD veículo, $p<0,05$; **e**, vs PF E₂-benzoato, ETOH veículo, $p<0,001$; **f**, vs ETOH E₂-benzoato, WD E₂-benzoato, $p<0,001$; **g**, vs WD veículo, $p<0,05$; **h**, vs ETOH E₂-benzoato, $p<0,01$; **i**, vs ETOH E₂-benzoato, WD veículo, $p<0,001$.

DISCUSSÃO

A literatura disponível refere clara e extensivamente a capacidade do etanol para alterar dramaticamente várias funções fisiológicas, endócrinas e comportamentais (Froy, 2007). Entre outros efeitos foi já referido que a exposição ao etanol induz marcadas perturbações nos ritmos circadianos quer no Homem quer em animais de experimentação (Clark *et al.*, 2007), na ingestão de alimentos (Aguiar *et al.*, 2004), na ingestão de líquidos particularmente de soluções contendo etanol (Aguiar *et al.*, 2004) e na produção hormonal designadamente de corticosterona (Rivier, 1993; Sipp *et al.*, 1993). Deve, no entanto, ser salientado que a bibliografia existente se refere essencialmente aos efeitos do etanol sobre o sexo masculino pelo que nos pareceu relevante monitorizar alguns parâmetros associados aos efeitos descritos nas fêmeas analisadas, nomeadamente o peso corporal, a ingestão sólida, a ingestão líquida, a alcoolémia e os níveis de corticosterona.

Sabe-se ainda que o consumo crónico de etanol é capaz de induzir stress oxidativo quer através da produção de radicais tóxicos quer através da diminuição dos níveis de antioxidantes endógenos (Colantoni *et al.*, 2000). De facto, foi já demonstrado existir uma clara associação entre os danos oxidativos mediados pelos radicais livres e a hepatotoxicidade induzida pelo etanol (Albano, 2006), pelo que os mecanismos através dos quais este tóxico promove o stress oxidativo e o papel dos radicais livres nos danos induzidos pelo mesmo são importantes áreas de investigação uma vez que a informação obtida poderá auxiliar, do ponto de vista terapêutico, na prevenção e/ou diminuição dos efeitos perniciosos deste xenobiótico (Das & Vasudevan, 2007).

Todavia, na etiopatogenia das lesões hepáticas dever-se-á ter ainda em conta a sinalização celular subsequente e os factores de transcrição associados. Sabe-se que o consumo crónico de etanol induz apoptose no tecido hepático (Zhou *et al.*, 2001), tanto em roedores (Baroni *et al.*, 1994; Yacoub *et al.*, 1995) como no Homem (Jiang *et al.*, 1997). Os mecanismos moleculares envolvidos nesta morte celular programada incluem a família de proteases de cisteína designadas genericamente por caspases. Destas, destaca-se a caspase 3 uma vez que é activada em resposta a numerosos estímulos de morte celular (Porter & Janicke, 1999), entre os quais se inclui a libertação do cyt c da mitocôndria (Jiang & Wang, 2004). Acresce ainda que a activação do factor de transcrição NF- κ B foi também já relacionada com a indução de stress oxidativo (Bowie & O'Neill, 2000; Schoonbroodt & Piette, 2000) e com a apoptose (Baichwal & Baeuerle,

1997), podendo, no segundo caso, desempenhar um papel anti- ou pró-apoptótico consoante a linha celular em que é expresso (Baichwal & Baeuerle, 1997). A caracterização destes mecanismos celulares reveste-se de elevada importância uma vez que permitirá uma melhor elucidação de factores específicos que desempenham um papel preponderante na patofisiologia induzida pelo consumo crónico de etanol e pela sua abstinência.

Realça-se também que a importância do dimorfismo sexual associado a estes mecanismos não foi ainda alvo de estudos que permitam a completa elucidação da resposta dimórfica ao etanol e, principalmente, à abstinência alcoólica a nível hepático. Não obstante os estrogénios terem sido apontados como agentes antioxidantes (para revisão ver Straub, 2007), foi já verificado o efeito pernicioso do estradiol em níveis semelhantes aos observados durante a fase de proestro em animais submetidos a alcoolização. Com efeito, em fêmeas alcoolizadas e ovariectomizadas foi já descrita menor concentração sérica da transaminase da alanina e menor esteatose, inflamação e necrose hepática comparativamente a fêmeas alcoolizadas e intactas (Yin *et al.*, 2000).

1. PARÂMETROS GERAIS

Verificou-se menor peso corporal nas fêmeas alcoolizadas comparativamente ao peso corporal das fêmeas do grupo de controlo *ad libitum*. Sabe-se que apesar do elevado teor energético do etanol a sua contribuição calórica não é eficazmente utilizada (Bunout, 1999) pelo que urgia inserir um grupo de controlo nutricional no presente estudo. Com efeito, nas fêmeas do grupo de controlo isocalórico verificou-se evolução do peso corporal semelhante à exibida pelas fêmeas alcoolizadas devido à idêntica ingestão calórica nestes 2 grupos.

Quanto às fêmeas submetidas a abstinência alcoólica observou-se aumento do seu peso corporal relativamente às alcoolizadas, o que deverá estar relacionado com a cessação do consumo de etanol uma vez que o etanol promove a saciedade ao inibir a mobilidade gástrica (Buemann & Astrup, 2001) e modula negativamente o apetite e a ingestão de comida (Buemann & Astrup, 2001).

Com efeito, verificou-se ingestão sólida média significativamente menor nas fêmeas alcoolizadas comparativamente às fêmeas dos restantes grupos experimentais. A maior ingestão sólida observada nas fêmeas do grupo de controlo isocalórico comparativamente às fêmeas alcoolizadas prende-se com o tipo de restrição calórica efectuado. A quantidade de dieta sólida fornecida às fêmeas sob controlo nutricional foi

calculada de forma a que a sua ingestão calórica fosse equiparável à das fêmeas alcoolizadas. Decidiu-se proceder a este tipo de restrição calórica devido a ter sido anteriormente observada degenerescência hepática mediante tratamento isocalórico através da administração, por períodos prolongados, de dietas exclusivamente líquidas (evidência colhida no Instituto de Anatomia da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto) e, ainda, pelo facto da suplementação calórica através da adição de sacarose ou dextrose alterar as características dos nutrientes absorvidos e o metabolismo hepático dos hidratos de carbono.

Quanto às fêmeas abstinentes verificou-se aumento significativo da sua ingestão sólida média relativamente às fêmeas submetidas a alcoolização crónica, o que poderá estar relacionado com a cessação dos efeitos decorrentes do consumo de etanol já mencionados e, conseqüentemente, com a plausível normalização das vias metabólicas nestas fêmeas.

Não obstante ter sido mascarado o odor da solução de etanol com um corante alimentar, observou-se um consumo médio de líquidos significativamente menor nas fêmeas alcoolizadas comparativamente às fêmeas do grupo de controlo isocalórico. Torna-se pertinente salientar que o corante adicionado não constituiu fonte adicional nem de calorias nem de nutrientes pelo que não terá influenciado nem o estado nutricional nem a ingestão calórica das fêmeas submetidas a alcoolização. Muitos dos estudos que abordam a ingestão de etanol seguem o modelo de Lieber-DeCarli, com ou sem modificações, ou dietas exclusivamente líquidas contendo etanol. Como já se referiu, dados não publicados do Instituto de Anatomia da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto (Cadete Leite, 1988; Tavares, 1985) demonstram que sendo o modelo de alcoolização levado a cabo através de dietas unicamente líquidas é grande a degenerescência hepática. Há muitos outros modelos de administração experimental de etanol. Por exemplo, por via intraperitoneal, processo que induz sofrimento (Strbak *et al.*, 1998), através de sonda gástrica que induz stress contínuo (Strbak *et al.*, 1998) e por via gasosa que, apesar de ser uma boa metodologia em estudos de curta duração, falha porquanto não ocorre absorção de etanol a nível intestinal, factor crucial quando se pretende avaliar a hepatotoxicidade induzida pelo mesmo. É, pois, lícito inferir que não há modelos experimentais de administração de etanol perfeitos se tivermos em linha de conta que não são representativos da realidade no Homem.

Foi descrito existir um ritmo circadiano associado à ingestão de etanol (Bell *et al.*, 2006) que se assemelha ao ritmo da ingestão de alimentos (Froy, 2007). De facto, os resultados obtidos evidenciaram uma alcoolémia significativamente maior às 22h00m do

que às 10h00m. Os estudos que abordam o padrão de ingestão *ad libitum* de etanol em fêmeas adultas são escassos. No entanto, foi já demonstrada em fêmeas alcoolizadas durante 6 meses variação diurna da taxa de etanol no sangue semelhante à observada neste estudo (Silva *et al.*, 2009) sendo os valores de alcoolémia obtidos igualmente idênticos aos descritos no trabalho referido.

Sabe-se ainda que a metabolização do etanol ocorre predominantemente a nível hepático (Badger *et al.*, 2000) e que a alcoolização crónica induz hiperplasia hepática (Thurman *et al.*, 1999) que se encontra associada à hipertrofia dos hepatócitos pelo que se avaliou o peso relativo do fígado das fêmeas estudadas.

De facto, verificou-se que o peso relativo do fígado das fêmeas alcoolizadas aumentou significativamente em relação às fêmeas do grupo de controlo isocalórico demonstrando-se assim a influência do etanol *per se* sobre este parâmetro, uma vez que a ingestão calórica dos animais submetidos a estas duas condições experimentais foi semelhante. Com efeito, foi já demonstrado por outros autores que o consumo crónico de etanol conduz ao aumento do peso relativo e absoluto do fígado em relação ao controlo nutricional, tanto em machos como em fêmeas (Tadic *et al.*, 2002).

Verificou-se ainda não existir diferença significativa entre o peso relativo do fígado apresentado pelas fêmeas abstinentes e as do grupo de controlo *ad libitum*. No entanto, deve referir-se que os valores apresentados pelas fêmeas submetidas a abstinência também não foram estatisticamente distintos dos observados nas fêmeas alcoolizadas. Onde, dada a quase completa inexistência de estudos sobre abstinência alcoólica a nível hepático, parece-nos importante a realização de estudos posteriores no sentido de elucidar a resposta hepática mediante abstinência alcoólica.

Ao avaliar o efeito da administração de estradiol sobre o peso relativo do fígado verificou-se, com excepção do grupo de controlo nutricional, diminuição deste parâmetro mediante administração de estrogénio. Embora exista evidência, tanto *in vitro* como *in vivo*, que os estrogénios têm uma acção estimuladora sobre os hepatócitos (Barone *et al.*, 2006), diferenças na dose, duração e forma de administração da suplementação hormonal poderão estar na base das diferenças observadas.

2. HORMONAS

A corticosterona é o esteróide circulante mais abundante no Rato e, simultaneamente, o glucocorticóide predominantemente produzido pelo córtex das glândulas supra-renais nesta espécie (Peron, 1960). A sua produção está associada ao

ritmo circadiano destes animais, apresentando picos mais elevados no final do dia (Madeira *et al.*, 1997; Solberg *et al.*, 2001), podendo a sua concentração plasmática ser utilizada como índice da estimulação da produção de corticóides (Ellis, 1966). Sabe-se que o etanol *per se* é considerado como factor de stress (Macho *et al.*, 2003), estimulando consequentemente o eixo hipotálamo-pituitária-supra-renais (Ogilvie & Rivier, 1997; Seeley *et al.*, 1996), estimulação esta que se manifesta pelo aumento da concentração plasmática de corticosterona (Rivier, 1993; Sipp *et al.*, 1993), existindo uma relação directa entre a concentração de etanol no sangue e o nível plasmático desta hormona (Ellis, 1966; Rivier, 1993).

Verificou-se que as fêmeas submetidas a alcoolização crónica apresentaram níveis médios de corticosterona significativamente menores que os exibidos pelas fêmeas do grupo de controlo nutricional. Não obstante diferenças no modelo experimental esta observação encontra-se em concordância com trabalhos de outros autores (Macho *et al.*, 2003; Strbak *et al.*, 1998). Dois factores poderão contribuir para o resultado obtido. Sabe-se que a restrição calórica *per se* aumenta os níveis plasmáticos de corticosterona (Ling & Bistran, 2009; Stamp *et al.*, 2008). Acresce que, apesar de estar descrito na literatura que a exposição ao etanol, tanto aguda como por pequenos períodos, induz aumento dos níveis circulantes de corticosterona, existe evidência que a exposição prolongada poderá levar a uma adaptação do eixo hipotálamo-pituitária-supra-renais (Madeira *et al.*, 1997) pelo que os valores observados poderão ser reflexo deste processo bem como das alterações do circadianismo da corticosterona induzidas pelo etanol.

Relativamente às fêmeas abstinentes não se observou diferença significativa na concentração de corticosterona comparativamente às fêmeas do grupo de controlo *ad libitum*. É, no entanto, de salientar que em fêmeas submetidas a idênticas condições experimentais os níveis de corticosterona atingiam valores inferiores aos dos grupos de alcoolização e de controlo puro após abstinência (Silva *et al.*, 2009).

Avaliou-se também o efeito do estrogénio sobre os níveis séricos de corticosterona tendo-se verificado que nos grupos de alcoolização e de controlo isocalórico a administração de estradiol não induziu alteração significativa na concentração desta hormona. No entanto, foi já demonstrada a influência positiva dos esteróides sexuais femininos na resposta ao stress (Rivier, 1993; Viau & Meaney, 1991), nomeadamente sobre os níveis de corticosterona, e a presença de receptores de estrogénio no córtex das glândulas supra-renais (Atkinson & Waddell, 1997). Como foi anteriormente mencionado, a exposição continuada ao etanol conduz à adaptação do eixo hipotálamo-pituitária-supra-renais pelo que a ausência de efeito positivo dos estrogénios sobre os níveis de corticosterona deverá estar associado ao défice nutricional e não à exposição ao etanol uma vez que se verificou o mesmo resultado nas fêmeas do

grupo de controlo isocalórico. Pelo que nos parece lícito inferir que a restrição calórica deve, através de um mecanismo ainda não elucidado, modular a resposta ao stress de forma independente dos níveis de esteróides sexuais femininos. Verificou-se ainda um aumento do nível de corticosterona mediante suplementação hormonal nas fêmeas abstinentes e nas fêmeas alimentadas *ad libitum*, o que se encontra em concordância com o descrito previamente (Rivier, 1993; Viau & Meaney, 1991).

De forma a comprovar a alteração dos níveis circulantes de estradiol mediante terapia hormonal procedeu-se à quantificação da sua concentração no soro tendo-se verificado aumento significativo do nível sérico de estradiol nas fêmeas às quais foi administrado benzoato de estrogénio relativamente às fêmeas que não receberam suplementação hormonal, independentemente do seu grupo experimental. É, no entanto, de salientar que o nível de estradiol, mediante administração de estrogénio, não variou significativamente entre os grupos controlo isocalórico, alcoolização crónica e abstinência alcoólica tendo, todavia, sido menor que o determinado no grupo de controlo *ad libitum*.

Procedeu-se também à colheita do útero de todas as fêmeas utilizadas neste estudo, tendo-se verificado aumento do peso uterino absoluto em todas as fêmeas que receberam suplementação hormonal, independentemente do seu grupo experimental, o que comprovou a acção do estrogénio a nível periférico e nos garantiu a sua correcta administração.

Efectuou-se ainda o doseamento de progesterona com intuito de avaliar se a administração de estrogénio induziria algum efeito sobre o nível circulante desta hormona. Contudo, verificou-se que a administração de estradiol não surtiu, regra geral, qualquer efeito sobre o nível de progesterona.

3. STRESS OXIDATIVO

O stress oxidativo é um dos mais importantes mecanismos de lesão hepática (Czaja, 2007), podendo ser definido como uma condição na qual se observa desequilíbrio entre a produção de espécies oxidantes e a capacidade antioxidante celular, enzimática e não enzimática, para prevenir o dano oxidativo (Morel & Barouki, 1999; Thannickal & Fanburg, 2000). Daqui se pode inferir que as lesões induzidas por este tipo de stress celular podem resultar da produção excessiva de espécies oxidantes e/ou diminuição dos mecanismos antioxidantes endógenos (Czaja, 2007). Em condições fisiológicas, as ROS são produzidas em pequenas concentrações como produto secundário da respiração

mitocondrial (Czaja, 2007; Morel & Barouki, 1999). De forma a prevenir a sua acumulação e possíveis efeitos deletérios, os sistemas antioxidantes actuam como *scavengers* de ROS (Morel & Barouki, 1999). No entanto, na presença de agentes indutores de stress oxidativo, como é o caso do etanol, os antioxidantes endógenos podem não ter capacidade de responder de forma eficaz ou até mesmo serem insuficientes conduzindo, consequentemente, a elevadas concentrações intracelulares de ROS (Liu *et al.*, 1997). Adicionalmente, os hepatócitos podem ser expostos a níveis elevados de ROS exógenas produzidas por estimulação de células inflamatórias (Czaja, 2007), como por exemplo as células de Kupffer que se sabe serem activadas quando há lesão hepática consequente à ingestão crónica de etanol.

O stress oxidativo é reconhecido como sendo um dos mecanismos na génese de patologias hepáticas de origem alcoólica (Higuchi *et al.*, 1996). Foi, por isso, objectivo do presente trabalho avaliar parâmetros associados ao stress oxidativo uma vez que este é apontado como regulador de lesão e de morte celular a nível hepático, nomeadamente nos hepatócitos, por alteração de vias de transdução de sinal, dos níveis de antioxidantes endógenos e de alterações químicas de moléculas celulares incluindo as proteínas e os lípidos (Czaja, 2007). Assim, procedeu-se à determinação da concentração de MDA, indicativa de peroxidação lipídica, da concentração de grupos carbonilo, como sinal dos danos oxidativos sobre as proteínas, e da concentração de GSH e de GSSG, para avaliar o estado antioxidante celular.

A peroxidação lipídica é um processo de deterioração oxidativa dos lípidos polinsaturados mediado por radicais livres derivados do oxigénio no qual os metais desempenham papel importante como catalisadores durante não só a fase de iniciação mas também nas reacções subsequentes (Gutteridge, 1981). A nível hepático, a ingestão crónica de etanol induz a formação do radical anião superóxido, de peróxido de hidrogénio e do radical hidroxilo (Bautista & Spitzer, 1999). Este último é a espécie oxidante mais reactiva tendo a capacidade de abstrair átomos de hidrogénio de moléculas vizinhas, essencialmente lípidos (Comporti, 1998; Gutteridge & Halliwell, 1990). Ao abstrair um átomo de hidrogénio das ligações duplas dos ácidos gordos presentes nas membranas celulares, este radical permite a iniciação do processo de peroxidação lipídica. Esta degradação oxidativa dos lípidos culmina com a formação de compostos carbonílicos, nomeadamente o MDA, processo este que tem a capacidade de se propagar de forma contínua e cíclica devido à constante formação de radicais lipídicos (Comporti, 1998).

A modificação oxidativa das proteínas pode ser devida a uma miríade de processos fisiológicos e patológicos, modificações estas que podem resultar de danos

directos induzidos por ROS (Stadtman, 1993), oxidação mediada por metais ou radiação (Levine *et al.*, 1994), moléculas geradas pela oxidação de outros compostos, nomeadamente aldeídos resultantes da peroxidação lipídica (Uchida & Stadtman, 1992) ou ainda por glicoxidação (Lee & Shacter, 1995). Todos estes processos podem, em última instância, resultar na introdução de grupos carbonilo nas proteínas (Reznick & Packer, 1994), pelo que a avaliação da presença destes grupos associados às proteínas é usada como marcador de modificação oxidativa das mesmas. Os danos oxidativos nas proteínas intracelulares são extraordinariamente relevantes dado que podem alterar a sua função fisiológica uma vez que as proteínas oxidadas perdem frequentemente a sua actividade catalítica e encontram-se mais vulneráveis para formar grandes agregados potencialmente citotóxicos (Judge *et al.*, 2004), podendo ainda apresentar sensibilidade aumentada para a desnaturação e maior susceptibilidade à proteólise (Grune *et al.*, 1997). De facto, a oxidação das proteínas tornou-se um campo importante de investigação na doença hepática dada a capacidade dos danos oxidativos proteicos para alterar vias de transdução de sinal particularmente as envolvidas em eventos, nomeadamente a morte celular, que conduzem à manifestação clínica da hepatotoxicidade de vários xenobióticos, incluindo o etanol (Han *et al.*, 2006).

O tripéptido γ -glutamylcysteinylglycine, comumente denominado por glutathione, é considerado o principal tiol não proteico intracelular encontrando-se presente em praticamente todas as células dos mamíferos (Hentze *et al.*, 2000), sendo vital para as defesas antioxidantes intracelulares (Rouach *et al.*, 1997). Em virtude do grupo sulfidrílico, este tiol exibe elevada reactividade o que lhe confere um papel crucial na homeostasia celular (Adams *et al.*, 1983). Actua como *scavenger* de radicais livres, reagindo directamente com essas espécies, contribuindo para a manutenção do potencial redox celular, factor essencial para a funcionalidade de determinadas enzimas, encontra-se envolvido na regeneração do α -tocoferol e na inibição da peroxidação lipídica (Rover *et al.*, 2001) e desempenha ainda um papel importante na manutenção dos grupos sulfidrílico proteicos (Rouach *et al.*, 1997). A glutathione pode ser encontrada sob duas formas, reduzida e oxidada, correspondendo a última à forma dimerizada de GSH. A concentração total intracelular de glutathione pode variar consideravelmente, particularmente no fígado, o órgão mais rico neste tripéptido e seu local de síntese (Gerard-Monnier & Chaudiere, 1996). Em condições fisiológicas, a GSSG representa apenas uma pequena fracção da glutathione total, porém, em condições de stress oxidativo, incluindo a alcoolização crónica, os níveis hepáticos de GSH podem diminuir drasticamente reduzindo, consequentemente, o quociente GSH/GSSG (Hentze *et al.*, 2000). Existe evidência que, para além da sua acção antioxidante, a GSH participa em processos de sinalização celular, quer por alteração da concentração total de glutathione

quer da razão GSH/GSSG (Thannickal & Fanburg, 2000). Realçam-se ainda as inúmeras funções celulares controladas pela razão GSH/GSSG, nomeadamente o controlo de enzimas chave de vias metabólicas, o crescimento celular, a transcrição génica e a apoptose (Hentze *et al.*, 2000). Dadas as suas propriedades, pode assumir-se que a GSH tem um papel muito importante na defesa celular e que a sua depleção resulta na exacerbação da toxicidade fomentada por agressores celulares. Assim, a determinação dos níveis de GSH e de GSSG pode ser considerada como uma boa indicação da capacidade fisiológica de resposta protectora das células.

No presente estudo verificou-se aumento significativo da peroxidação lipídica nas fêmeas alcoolizadas relativamente às do grupo de controlo isocalórico pelo que os danos lipídicos observados se encontram relacionados com a acção do etanol por si só. A revisão da literatura demonstrou que não existe uniformidade nos resultados descritos relativos à peroxidação lipídica resultante da alcoolização crónica. Todavia, são vários os estudos realizados em machos alcoolizados, ainda que com período de tratamento, via de administração e percentagem de etanol distintas, que reconhecem o aumento da peroxidação lipídica (Das & Vasudevan, 2005; de la Monte *et al.*, 2008; Dey & Cederbaum, 2006; Ferreira Seiva *et al.*, 2009; Kasdallah-Grissa *et al.*, 2006; Pushpakiran *et al.*, 2004) como consequência do aumento da produção de ROS resultantes da metabolização do etanol e/ou diminuição dos níveis de antioxidantes endógenos. Foi igualmente descrito aumento dos danos oxidativos nos lípidos em fêmeas submetidas a alcoolização durante 8 semanas e sacrificadas na fase de proestro comparativamente ao respectivo controlo (Colantoni *et al.*, 2000).

Quanto às fêmeas abstinentes observou-se aumento da peroxidação lipídica relativamente às fêmeas do grupo de controlo *ad libitum* e às fêmeas do grupo de alcoolização crónica. Foi já descrita menor peroxidação lipídica em animais abstinentes em relação a animais alcoolizados e controlo (Ferreira Seiva *et al.*, 2009). Contudo, o trabalho referenciado foi realizado em machos e não em fêmeas e o período experimental, tanto de alcoolização como de abstinência, foi distinto.

Deve ainda ser realçado que a administração de estrogénio conduziu ao aumento dos danos lipídicos em todos os grupos experimentais apesar do estradiol ser descrito na literatura como hormona antioxidante com forte actividade inibidora relativamente à degradação oxidativa dos lípidos (Miura *et al.*, 1996). Com efeito, foi demonstrado num estudo de envelhecimento realizado em fêmeas ovariectomizadas com 24 meses de idade e tratadas diariamente com estradiol durante os 21 dias que antecederam a sua morte que a administração de estrogénio actua como agente protector contra a peroxidação lipídica (Kiray *et al.*, 2007). No entanto, os esteróides

sexuais foram já apontados como capazes de modular a formação de ROS e actuar como agentes anti- ou pró-oxidantes de acordo com a sua concentração e o sistema em estudo (Colantoni *et al.*, 2000). Mais, os estrogénios podem ser considerados como factor determinante no agravamento das lesões hepáticas induzidas pela ingestão de etanol manifestadas pelo sexo feminino (Maher, 1998), pelo que poderão igualmente desempenhar papel importante na degradação oxidativa dos lípidos observada nas fêmeas abstinentes.

No que diz respeito à oxidação proteica, observou-se concentração significativamente menor de grupos carbonilo nas fêmeas alcoolizadas comparativamente às do grupo de controlo isocalórico. Sabe-se que as proteínas celulares são um dos alvos primários dos radicais livres gerados pela ingestão de etanol e que as reacções subsequentes desses radicais resultam em oxidação proteica a nível hepático e, consequentemente, no aumento de grupos carbonilo presentes nas proteínas celulares (Rouach *et al.*, 1997). Com efeito, foi verificado aumento de grupos carbonilo em fêmeas alcoolizadas durante 8 semanas (Colantoni *et al.*, 2000). Por outro lado, encontra-se documentado que a restrição calórica diminui o stress oxidativo fisiológico e atenua a oxidação proteica (Heilbronn *et al.*, 2006; Judge *et al.*, 2004). No entanto, após revisão da literatura foi possível apurar que existem estudos, ainda que escassos, que mencionam aumento do teor de grupos carbonilo mediante restrição calórica. Por exemplo, no coração de Ratos Fisher observou-se aumento significativo de grupos carbonilo, tanto nas proteínas citosólicas como nas mitocondriais, não obstante o menor nível de peróxido de hidrogénio verificado (Judge *et al.*, 2004). Na interpretação da diminuição da concentração de grupos carbonilo observada nas fêmeas alcoolizadas, há que ter em consideração dois factores. Em primeiro lugar, diferenças no modelo experimental, estirpe, idade de iniciação e duração da restrição calórica podem contribuir para diferentes resultados (Valle *et al.*, 2007). Em segundo lugar, embora as defesas antioxidantes celulares sejam altamente eficazes não são capazes de prevenir totalmente os danos proteicos induzidos pelas ROS. Dado que muitas modificações oxidativas das proteínas são irreversíveis é essencial a existência de um mecanismo eficaz de remoção das proteínas danificadas para impedir a acumulação de agregados proteicos potencialmente tóxicos (Judge *et al.*, 2004). É provável que a menor concentração de grupos carbonilo observada nas fêmeas alcoolizadas relativamente às submetidas a restrição calórica se deva ao facto das proteínas danificadas terem sofrido reacções subsequentes de forma a minimizar a sua concentração conduzindo, naturalmente, a menor concentração de grupos carbonilo disponíveis para detecção. Com efeito, foi já descrito que o proteassoma é inibido pelo consumo crónico de etanol (Bardag-Gorce,

2009), sabendo-se igualmente que a sua inibição se encontra directamente relacionada com uma menor degradação de proteínas oxidadas (Sitte *et al.*, 1998).

Relativamente às fêmeas abstinentes observou-se concentração de grupos carbonilo semelhante à observada nas fêmeas do grupo de controlo *ad libitum*. Este resultado não foi indicativo de regularização metabólica dado que foi igualmente verificada ausência de diferença significativa entre o nível de grupos carbonilo exibido pelas fêmeas abstinentes comparativamente ao observado nas fêmeas alcoolizadas. Tendo em consideração os resultados obtidos para as fêmeas abstinentes e a quase completa inexistência de trabalhos que abordam abstinência alcoólica a nível hepático torna-se, pois, evidente a necessidade de estudos adicionais nesta temática.

Realça-se ainda que a administração de estradiol não surtiu qualquer efeito sobre a concentração de grupos carbonilo em todos os grupos experimentais analisados. Embora se saiba que os estrogénios protegem o sexo feminino uma vez que regulam positivamente a expressão de genes que codificam enzimas antioxidantes (Vina *et al.*, 2006), de acordo com o que foi possível apurar, não existem estudos sobre os efeitos do estrogénio sobre a cascata metabólica associada à oxidação proteica a nível hepático pelo que estudos complementares são necessários.

Quanto aos níveis de glutathione verificou-se que a alcoolização das fêmeas resultou, grosso modo, na diminuição do nível de GSH e de GSSG comparativamente às fêmeas do grupo de controlo nutricional. Os resultados publicados relativos aos efeitos do etanol sobre o nível deste tiol a nível hepático são discrepantes. Enquanto alguns estudos reportam que o nível de glutathione se mantém inalterado (Deaciuc *et al.*, 1999), outros mencionam que se encontra aumentado (Oh *et al.*, 1998; Teare *et al.*, 1994) ou diminuído (Das & Vasudevan, 2005; Hentze *et al.*, 2000). De salientar que estes estudos foram realizados em machos e em condições experimentais distintas das utilizadas neste estudo. Acresce que a razão GSH/GSSG, indicativa do estado redox e antioxidante celular, está igualmente diminuída nas fêmeas submetidas a alcoolização relativamente às do grupo de controlo nutricional, pelo que se demonstra a capacidade do etanol para diminuir as defesas antioxidantes celulares.

Relativamente às fêmeas abstinentes verificou-se diminuição da concentração de GSH comparativamente às do grupo de controlo *ad libitum*. Acresce ainda que não se descobriu diferença relevante do nível de GSH exibido pelas fêmeas submetidas a abstinência relativamente às expostas a alcoolização. Observou-se ainda que a abstinência alcoólica conduziu ao aumento do nível de GSSG em relação às fêmeas do controlo *ad libitum* mas não induziu alteração da concentração de GSSG relativamente às fêmeas alcoolizadas, resultados estes igualmente verificados para a razão GSH/GSSG.

Pelo que se deduz que a abstinência por si só não conseguiu reabilitar a defesa antioxidante endógena associada a este tiol. Salienta-se que, tanto quanto é do nosso conhecimento, que esta foi a primeira vez que estes resultados foram descritos em condições de abstinência alcoólica a nível hepático.

Ao analisar o efeito do estrogénio verificou-se que, enquanto a administração de estradiol manteve inalterado o nível de GSH nas fêmeas alcoolizadas, aumentou expressivamente a concentração de GSH nas fêmeas do grupo de controlo isocalórico. É, portanto, lícito concluir que, no modelo experimental utilizado, a administração de estrogénio confere às fêmeas nutricionalmente controladas protecção acrescida, efeito este que não parece suficiente para minimizar os efeitos decorrentes da ingestão de etanol observados nas fêmeas alcoolizadas. Verificou-se ainda que a concentração de GSH nas fêmeas abstinentes não foi alterado pela administração de estradiol, contrariamente ao observado nas fêmeas do grupo de controlo *ad libitum*. Observou-se também que a administração de estrogénio resultou na diminuição da concentração de GSSG no grupo de fêmeas abstinentes comparativamente às fêmeas do grupo de controlo *ad libitum* sem, no entanto, contribuir para a melhoria do estado antioxidante celular traduzido pela razão GSH/GSSG.

Em resumo, os resultados obtidos permitem concluir que o etanol, quando ingerido durante longos períodos, e a sua subsequente abstinência diminuem a capacidade antioxidante celular e que os estrogénios não induzem alteração significativa da razão GSH/GSSG a nível hepático, o que reflete ausência de modulação da glutatona pelos estrogénios.

4. APOPTOSE

O organismo possui processos activos de regulação celular que, em conjunto com a divisão e o crescimento celular, são indispensáveis à homeostasia de vários tecidos. Alguns desses processos, por obedecerem a uma estratégia bem definida, activa e altamente regulada, foram designados por morte celular geneticamente programada, geralmente denominada por apoptose. Este tipo de morte celular é responsável pela manutenção dos tecidos e de funções vitais dos diferentes órgãos, incluindo o fígado (Hentze *et al.*, 2000), permitindo ao organismo eliminar células lesadas ou de algum modo indesejadas tanto em condições fisiológicas como patológicas (Adrain & Martin, 2001; Guicciardi & Gores, 2005; Hoek & Pastorino, 2002; Porter & Janicke, 1999). Esta morte celular programada é morfológica, molecular e bioquimicamente distinta da necrose (Budihardjo *et al.*, 1999). A activação bioquímica de moléculas efectoras é

responsável pelas alterações morfológicas observadas durante o processo apoptótico, incluindo diminuição acentuada do volume celular, perda do potencial de membrana pelas mitocôndrias, alterações da permeabilidade da membrana mitocondrial, degradação da membrana nuclear, fragmentação do DNA, condensação da cromatina, *blebbing* da membrana plasmática e formação de corpos apoptóticos (Adrain & Martin, 2001; Circu & Aw, 2008; Porter & Janicke, 1999). A apoptose fisiológica encontra-se restrita a pequenos grupos de células e ocorre de forma controlada, sendo as células apoptóticas rápida e eficazmente removidas por fagocitose (Adrain & Martin, 2001) e repostas por novas células geradas por mitose (Guicciardi & Gores, 2005). Já a apoptose associada a condições patológicas, tanto agudas como crónicas, envolve grandes agregados celulares, não é selectiva e ocorre frequentemente num ambiente inflamatório (Guicciardi & Gores, 2005).

Dado o seu importante papel biológico, o conhecimento dos mecanismos celulares e moleculares da apoptose, ou da sua desregulação em algumas patologias, representa uma ferramenta importante tanto no diagnóstico como no tratamento dessas patologias. O consumo de etanol induz apoptose numa miríade de tecidos, incluindo o hepático (Zhou *et al.*, 2001), tanto no Homem como em animais de laboratório (Deaciuc *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2001). A resposta apoptótica do fígado à ingestão crónica de etanol permanece mal caracterizada (Deaciuc *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2001). Todavia, sabe-se que está relacionada com o aumento da concentração intracelular de ROS (Deaciuc *et al.*, 2001b) e que o mecanismo activado pelas diferentes linhas celulares hepáticas na iniciação e execução da apoptose em resposta ao etanol varia de acordo com o tipo de célula, bem como com a origem e natureza do estímulo indutor e a necessidade da síntese *de novo* de proteínas apoptóticas (Deaciuc *et al.*, 2001a). Sabe-se, por exemplo, que os hepatócitos sofrem apoptose sem alterar a taxa de síntese *de novo* de proteínas envolvidas neste tipo de morte celular (Deaciuc *et al.*, 2004), necessitando somente da compartimentalização intracelular de alguns reguladores apoptóticos e a conversão de caspases na sua forma activa, pelo que a maquinaria apoptótica pré-existente parece ser suficiente para o desenrolar da apoptose. A diminuída capacidade celular para responder ao stress pode resultar directamente da deterioração induzida pelo próprio etanol e/ou da promoção de cascatas de sinalização apicais que transmitem sinais de stress à mitocôndria (Hoek & Pastorino, 2002). Sabe-se que o tratamento com etanol induz alterações nos mecanismos de defesa celular que controlam o balanço entre proteínas anti- e pró-apoptóticas que actuam directamente sobre a mitocôndria (Hoek & Pastorino, 2002), tendo já sido descrito que o consumo crónico de etanol induz efectivamente disfunção mitocondrial no fígado (de la Monte *et al.*, 2008).

A apoptose requer a acção coordenada e regulada de várias moléculas que actuam como reguladoras ou efectoras do processo apoptótico. Sabe-se que a apoptose induzida pela ingestão de etanol pode ocorrer por alteração de sinais intracelulares e/ou activação de receptores de morte da membrana citoplasmática. O processo apoptótico induzido por alteração de sinais intracelulares, a via intrínseca da apoptose, caracteriza-se pela alteração da expressão de proteínas reguladoras, tanto anti- como pró-apoptóticas, pela libertação de factores apoptogénicos da mitocôndria e pela activação de caspases. Foi, por isso, propósito deste estudo avaliar factores associados à regulação e execução da apoptose tendo-se determinado níveis da proteína Bcl-2, que actua como regulador anti-apoptótico, concentração de cyt c citosólico, indicativo de dano mitocondrial e indutor da activação de caspases, e actividade da caspase 3, a principal caspase efectora.

Várias classes de organismos, incluindo os mamíferos, possuem um grupo de proteínas, a família Bcl-2, que actuam como reguladores apoptóticos (Brunelle & Letai, 2009). Os membros anti-apoptóticos desta família são capazes de minimizar a disfunção do metabolismo mitocondrial (Harris & Thompson, 2000). A proteína Bcl-2, um dos membros anti-apoptóticos deste grupo proteico (Brunelle & Letai, 2009), é uma proteína membranar que está localizada predominantemente na membrana externa da mitocôndria (Kluck *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1997), tendo já sido evidenciado o seu papel como inibidor da apoptose induzida por diversos estímulos, entre os quais o etanol (Tsujimoto, 2003), pelo que pode ser considerada como modulador negativo da apoptose. O mecanismo bioquímico através do qual a proteína Bcl-2 regula a apoptose não se encontra ainda perfeitamente esclarecido, mas crê-se que esta proteína, devido à sua localização, modula directamente a permeabilidade da membrana mitocondrial regulando, desta forma, a libertação de factores apoptogénicos, incluindo o cyt c (Tang *et al.*, 1998), da mitocôndria para o citosol (Tsujimoto, 2003). Acresce que esta proteína tem a capacidade de impedir o aumento da matriz mitocondrial, de prevenir danos induzidos por ROS e perda do potencial de membrana (Harris & Thompson, 2000) e ainda de sequestrar proteínas pró-apoptóticas (Brunelle & Letai, 2009) ao estabelecer dímeros com essas mesmas proteínas uma vez activadas (Brunelle & Letai, 2009; Tsujimoto, 2003).

Como já se mencionou, durante o processo apoptótico podem ser libertados da mitocôndria factores apoptogénicos, factores estes que participam na activação de caspases e na degradação do DNA (Harris & Thompson, 2000), entre os quais o cyt c. O cyt c é uma proteína normalmente presente no espaço intermembranar mitocondrial sendo um elemento importante da cadeia respiratória e da síntese de ATP (Tang *et al.*, 1998) e desempenhando ainda um papel crucial na regulação da apoptose (Harris &

Thompson, 2000). À semelhança de outras moléculas envolvidas na apoptose, esta proteína encontra-se, em condições normais, sequestrada na mitocôndria sendo desta forma impedida de interagir com as suas moléculas alvo e os seus co-factores (Harris & Thompson, 2000). Porém, quando a mitocôndria é danificada ou sinalizada no sentido de destruir a sua membrana externa (Garrido *et al.*, 2006; Schug & Gottlieb, 2009), por exemplo quando as células recebem estímulos apoptóticos, o cyt c é libertado para o citosol (Schug & Gottlieb, 2009) induzindo a activação de efectores distais do processo apoptótico. Uma vez no citosol, e na presença de ATP ou deoxiATP, o cyt c medeia a activação alostérica e a oligomerização da molécula *apoptosis-protease activating factor*, conduzindo à formação do apoptossoma que, por sua vez, conduz à activação de caspases (Adrain & Martin, 2001; Brown & Borutaite, 2008; Garrido *et al.*, 2006), nomeadamente da caspase 3.

As caspases são proteases de cisteína responsáveis pela execução da apoptose. Estas proteases são primariamente expressas como pró-enzimas inactivas (Adrain & Martin, 2001; Slee *et al.*, 2001), sendo consideradas mediadores cruciais da apoptose uma vez que são responsáveis pela transdução de sinais apoptóticos tanto na fase de iniciação como de execução da apoptose (Lambert *et al.*, 2003). Dentro deste grupo, a caspase 3 parece desempenhar um papel crítico na apoptose dado que é activada em resposta a uma miríade de estímulos, incluindo o etanol (Lambert *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2001), e medeia muitas das alterações celulares apoptóticas, observadas tanto no núcleo como no citoplasma, através da activação ou inactivação proteolítica de diversas proteínas sendo, por essa razão, considerada a principal caspase efectora do processo apoptótico (Lambert *et al.*, 2003; Slee *et al.*, 2001). Deve, no entanto, salientar-se que a apoptose é regulada pela caspase 3 de forma dependente do tecido, da linha celular e/ou do estímulo indutor (Porter & Janicke, 1999). Em condições fisiológicas, a caspase 3 encontra-se no citoplasma sob forma inactiva; todavia, no decurso da apoptose, é clivada proteoliticamente tornando-se activa (Lambert *et al.*, 2003). Uma vez activada, inicia uma série de reacções em cadeia irreversíveis (Deaciu *et al.*, 1999) que conduzem à degradação de inúmeros substratos e, em última instância, à morte celular.

Relativamente aos resultados obtidos verificou-se que o nível de proteína Bcl-2 exibido pelas fêmeas alcoolizadas não diferiu do observado nas fêmeas do grupo de controlo nutricional, pelo que se concluiu que o etanol por si só não foi capaz de alterar o nível da proteína Bcl-2. De acordo com o que foi possível apurar, dados relativos a esta proteína em modelos de alcoolização semelhantes ao utilizado são escassos. Todavia, sabe-se que em machos aos quais foi administrada dieta líquida contendo etanol pelo

período de 14 semanas não se observaram diferenças no nível de RNA e de proteína Bcl-2 comparativamente aos animais do controlo isocalórico (Deaciuc *et al.*, 2001b). Estes dados sugerem que mecanismos pós-transcricionais adicionais podem estar envolvidos na modulação de reguladores apoptóticos. Acresce que a proteína Bcl-2 é fracamente expressa nos hepatócitos (Deaciuc *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2002), pelo que se infere que o principal regulador anti-apoptótico envolvido na apoptose induzida pelo consumo de etanol a nível hepático deverá ser outro membro desta família de proteínas.

Também não se observaram diferenças do nível de proteína Bcl-2 nas fêmeas abstinentes comparativamente às do grupo de controlo *ad libitum* e às submetidas a alcoolização crónica. Parece, pois, que a abstinência alcoólica também não foi capaz de modular *per se* a resposta desta proteína. Todavia, dada a escassez de trabalhos sobre abstinência alcoólica a nível hepático muito existe ainda por clarificar.

Acresce que não se verificou alteração do nível de proteína Bcl-2, em todos os grupos experimentais, quando se administrou benzoato de estrogénio. Foi previamente demonstrado que o estradiol promove a expressão de proteínas anti-apoptóticas, incluindo da Bcl-2, tanto *in vitro* como *in vivo* (Bagetta *et al.*, 2004). Todavia, não existem estudos nos quais a influência dos estrogénios sobre a proteína Bcl-2 a nível hepático tenha sido avaliada, sendo necessário realizar estudos complementares para esclarecer o mecanismo subjacente aos resultados obtidos que sugerem que os estrogénios poderão actuar via diferentes mecanismos que dependem da concentração, do tecido alvo, da dose e da estrutura química do composto administrado.

No que diz respeito ao cyt c verificou-se que a sua concentração citosólica foi superior no grupo de alcoolização crónica relativamente ao grupo de controlo isocalórico, o que está de acordo com os dados obtidos no tecido hepático do Ratinho após exposição aguda ao etanol (Zhou *et al.*, 2001). Este resultado é indicativo de danos mitocondriais acrescidos nas fêmeas alcoolizadas e pode ser atribuído à acção do etanol sobre as mitocôndrias..

Relativamente às fêmeas abstinentes verificou-se que estas apresentaram menor concentração citosólica de cyt c que as do grupo de alcoolização crónica, tendo esta concentração regredido para valores semelhantes aos observados no grupo de controlo *ad libitum*. Este resultado poder-se-á dever à eventual recuperação da integridade da membrana mitocondrial nesta condição experimental, evidenciando-se assim os efeitos benéficos da cessação do consumo de etanol. Estes dados são particularmente interessantes já que a literatura refere que a abstinência alcoólica aguda (24 horas após a cessação de ingestão de etanol) agrava os efeitos deletérios do consumo de etanol sobre a membrana mitocondrial (Jung *et al.*, 2007). Pelo contrário, os

resultados obtidos no presente trabalho mostram que a cessação prolongada do consumo de etanol conduz à regressão dos danos associados à sua ingestão o que indica que, ao contrário do etanol, a abstinência alcoólica não funciona como um factor adicional de agressão para as mitocôndrias.

Relativamente ao efeito do estrogénio, os resultados obtidos permitiram concluir que a administração de estradiol reduziu a concentração citosólica de cyt c em 10,4% nas fêmeas alcoolizadas e 12,5% nas fêmeas abstinentes. O papel protector dos estrogénios relativamente à integridade mitocondrial foi já descrito (Borrás *et al.*, 2003), tendo sido demonstrado que a ovariectomia aumenta a produção de peróxidos pela mitocôndria, efeito este que pode ser prevenido pela administração de estradiol (Borrás *et al.*, 2003). Os resultados obtidos permitem, pois, concluir que os estrogénios desempenham um papel importante na redução da carga oxidativa sobre a mitocôndria, mesmo em condições em que essa carga está aumentada como acontece durante o consumo prolongado de etanol.

Observou-se maior actividade da caspase 3 nas fêmeas alcoolizadas comparativamente às do grupo de controlo nutricional, o que permite concluir que o etanol por si só foi, no nosso modelo de alcoolização, capaz de induzir apoptose. Foi previamente descrita apoptose hepática, evidenciada pela activação da caspase 3, após ingestão de etanol, tanto aguda (Lambert *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2001) como crónica (Deaciuc *et al.*, 2001b), quer no fígado quer em hepatócitos isolados de Rato (Deaciuc *et al.*, 2001a).

Relativamente às fêmeas abstinentes não se observou variação significativa da actividade da caspase 3 relativamente à exibida tanto pelo grupo de alcoolização como pelo de controlo *ad libitum*. Estes dados sugerem a cessação do consumo de etanol permite uma normalização parcial das vias metabólicas que se sabe estarem envolvidas na indução de apoptose a nível hepático.

Apurou-se também que a administração de estradiol resultou no aumento significativo da actividade da caspase 3 no grupo de fêmeas alcoolizadas, mas não nas fêmeas abstinentes. Apesar de já ter sido referido que os estrogénios, nomeadamente o 17- β -estradiol, exercem efeitos benéficos em muitos sistemas celulares (Straub, 2007), existem referências na literatura que indicam que os estrogénios podem desempenhar um papel anti- ou pró-apoptótico de acordo com o modelo em estudo (Colantoni *et al.*, 2000). Donde muito existe por desvendar relativamente ao papel dos estrogénios, em níveis fisiológicos, na resposta a estímulos nocivos como por exemplo o etanol.

Ao analisar simultaneamente os resultados obtidos para o cyt c citosólico e a actividade da caspase 3 verificou-se que a activação desta protease se encontra

aumentada quando a concentração citosólica de cyt c se encontra diminuída. Este facto é importante uma vez que sugere que a via intrínseca não deverá, neste modelo experimental de alcoolização e abstinência, ser a principal via responsável pela morte celular por apoptose dada a aparente diminuição dos danos mitocondriais.

5. INFLAMAÇÃO

Estudos recentes demonstraram que a lesão hepática induzida por um ambiente celular oxidante é mediada pelos efeitos directos das ROS sobre vias de transdução de sinal (Czaja, 2007; Nagy, 2003). Não obstante a sinalização celular desencadeada pelo stress oxidativo ser complexa e dependente do agente indutor e duração da exposição, foram já identificadas algumas vias reguladoras associadas ao dano oxidativo sobre os hepatócitos (Czaja, 2007). Entre os vários factores de transcrição cuja actividade pode ser influenciada pelo stress oxidativo, o NF- κ B é considerado um dos mais importantes (Schoonbroodt & Piette, 2000). Foi já sugerido que a actividade deste factor de transcrição é regulada pelos níveis intracelulares de ROS (Li & Karin, 1999), embora os mecanismos celulares envolvidos nesta regulação não se encontrem claramente elucidados (Nagy, 2003). À semelhança do que acontece com outros factores de transcrição, o NF- κ B exhibe uma resposta dual ao stress oxidativo. Se por um lado o stress oxidativo pode induzir, *in vivo*, a sua translocação nuclear, por outro sabe-se que a activação do NF- κ B através de receptores de citoquinas pró-inflamatórias parece estar associada ao aumento intracelular de ROS (Schoonbroodt & Piette, 2000). Acresce ainda que o consumo crónico de etanol induz produção acrescida de ROS, pelo que a patologia hepática induzida pela ingestão continuada de etanol se encontra associada a uma condição de stress oxidativo crónico à qual se sucede secundariamente a activação do NF- κ B (Czaja, 2007).

O NF- κ B é um factor de transcrição multifuncional que se encontra associado à expressão de vários genes e à regulação de numerosos processos fisiológicos e celulares, desempenhando um papel importante na resposta imune, no controlo da proliferação celular, na inflamação, na apoptose e na resposta ao stress (Bowie & O'Neill, 2000; Li & Karin, 1999). Este factor de transcrição representa um grupo de proteínas diméricas estruturalmente relacionadas e evolutivamente conservadas associadas ao domínio Rel, surgindo nos mamíferos em 5 subunidades distintas (Singh & Jiang, 2004; Tripathi & Aggarwal, 2006). As proteínas NF- κ B/Rel existem sob a forma de homo ou heterodímeros que originam complexos competentes ou repressores do ponto de vista transcrricional. Em diferentes linhas celulares, o NF- κ B pode desempenhar funções

opostas por activação de padrões distintos de genes em conjugação com factores de transcrição específicos de uma dada linha celular (Baichwal & Baeuerle, 1997). Ao contrário do que se observa com outros factores de transcrição, as proteínas da família do NF- κ B encontram-se localizadas no citoplasma e têm, por isso, que se translocar para o núcleo para exercer a sua acção (Schoonbroodt & Piette, 2000). Em células não estimuladas, os homo ou heterodímeros encontram-se sequestrados no citoplasma por associação a inibidores da família das *inhibitor-kappaB* (Bowie & O'Neill, 2000; Tripathi & Aggarwal, 2006). Após estimulação com indutores do NF- κ B, a proteína inibitória é rapidamente fosforilada e degradada, libertando o dímero que é, então, translocado para o núcleo onde activa a transcrição de genes alvo (Baichwal & Baeuerle, 1997; Bowie & O'Neill, 2000; Schoonbroodt & Piette, 2000; Singh & Jiang, 2004) ao ligar-se, com alta afinidade, aos elementos *kappaB* dos promotores desses genes. De salientar que os genes alvo são regulados selectivamente devido à diferente capacidade transcricional dos dímeros translocados para o núcleo (Tripathi & Aggarwal, 2006).

Decidiu-se, no presente estudo, avaliar a presença das subunidades p50 e p65 (RelA) pelo facto destas proteínas serem as mais importantes nos hepatócitos (Czaja, 2007) e do heterodímero p50/p65 do NF- κ B ser a forma activa predominantemente presente em muitas células (Baichwal & Baeuerle, 1997; Bowie & O'Neill, 2000).

Ao avaliar o efeito do tratamento sobre a translocação nuclear do NF- κ B verificou-se aumento da translocação de ambas as subunidades analisadas nas fêmeas alcoolizadas comparativamente às fêmeas do grupo de controlo isocalórico, pelo que se pode concluir que a indução da resposta inflamatória observada no grupo de alcoolização crónica se deve à acção do etanol por si só e não à acção concertada do etanol e da restrição calórica. Sabe-se que machos e fêmeas Wistar aos quais foi administrada intragastricamente, durante 4 semanas, dieta exclusivamente líquida contendo elevado teor lipídico e etanol, apresentam níveis aumentados de NF- κ B relativamente aos respectivos controlos (Kono *et al.*, 2000). Outro estudo realizado em fêmeas da mesma estirpe demonstrou igualmente aumento do NF- κ B nos animais alcoolizados durante 8 semanas relativamente aos animais do grupo de controlo nutricional (Tipoe *et al.*, 2008).

Quanto às fêmeas abstinentes observou-se diminuição da translocação de ambas as subunidades do NF- κ B comparativamente às fêmeas alcoolizadas para níveis semelhantes aos observados nas fêmeas do grupo de controlo *ad libitum*. Da revisão da literatura apurou-se que a cessação do consumo de etanol se traduz na diminuição dos níveis circulantes de endotoxina (Bautista & Spitzer, 1999) o que induz menor activação das células de Kupffer (Das & Vasudevan, 2007) e, consequentemente, menor produção de moléculas biologicamente activas associadas a processos inflamatórios por parte

dessas células. Em conjunto, estes factos sugerem que em condições de abstinência alcoólica prolongada há regressão da condição inflamatória induzida pela ingestão continuada de etanol não obstante os resultados observados nos parâmetros associados ao stress oxidativo pelo que estudos adicionais são necessários para esclarecer a via associada.

Observamos também que nas fêmeas alcoolizadas a administração de estradiol induziu aumento da translocação do NF- κ B. Embora se saiba que os estrogénios desempenhem papel anti-inflamatório em vários modelos de lesão hepática (Straub, 2007), foi já relatado que estas hormonas são capazes de induzir o efeito oposto em modelos de ingestão alcoólica. Com efeito, há dados que mostram que a administração de estradiol, em doses que aumentam os níveis circulantes desta hormona para valores semelhantes aos observados durante a fase de proestro, a fêmeas ovariectomizadas e alcoolizadas durante 4 semanas, aumenta os níveis séricos de endotoxina, a infiltração leucocitária e a produção de factor de necrose tumoral para níveis superiores aos observados em fêmeas ovariectomizadas sem suplementação hormonal (Yin *et al.*, 2000). Estes dados sugerem que o estrogénio pode ter induzido, no nosso modelo experimental de alcoolização, sensibilidade aumentada das células de Kupffer para a acção da endotoxina. No que diz respeito às fêmeas abstinentes, a acção do estrogénio conduziu igualmente ao aumento da translocação do NF- κ B, o que parece estar em oposição com as propriedades anti-inflamatórias que têm sido reconhecidas ao estradiol. Acresce que, em muitos estudos que associam o estradiol à sua acção anti-inflamatória, os animais foram ovariectomizados no início do período experimental tendo, simultaneamente, sido expostos a doses de estradiol que ultrapassam o nível fisiológico observado durante a fase de proestro.

CONCLUSÕES

Em síntese, os resultados apresentados nesta dissertação demonstram que:

1. Nas presentes condições experimentais, o consumo crónico de etanol e a abstinência alcoólica não alteram significativamente o nível de corticosterona e que os estrogénios apenas têm a capacidade de modular positivamente os níveis séricos de corticosterona no grupo de controlo puro.
2. A alcoolização crónica aumenta a peroxidação lipídica a nível hepático, alterações estas que são agravadas pela cessação do seu consumo, sendo os efeitos deletérios do consumo prolongado de etanol e da sua subsequente abstinência sobre os lípidos celulares mais marcados na presença de estradiol.
3. No modelo experimental utilizado, a ingestão prolongada de etanol e subsequente abstinência não alteram os níveis da oxidação proteica no fígado, independentemente dos níveis circulantes de estrogénios.
4. A ingestão continuada de etanol e a sua subsequente abstinência diminuem a concentração de GSH e aumentam a de GSSG. Consequentemente, diminuem ainda a razão GSH/GSSG. A administração de estradiol modula a concentração de GSSG apenas nestas condições experimentais.
5. Nas condições utilizadas, tanto a alcoolização crónica como a abstinência alcoólica não alteram a concentração da proteína Bcl-2, independentemente da administração de estradiol.
6. Nas presentes condições experimentais, a ingestão prolongada de etanol aumenta a concentração citosólica do cyt c de forma independente dos níveis circulantes de estradiol. Pelo contrário, a abstinência alcoólica diminui a concentração citosólica de cyt c, particularmente na presença de estrogénios.
7. A alcoolização crónica aumenta a actividade da caspase 3, efeito este que é potenciado pela administração de estradiol. No entanto, a abstinência alcoólica não minora este efeito, quaisquer que sejam os níveis circulantes de estrogénios.

8. No modelo experimental utilizado, o consumo de etanol aumenta a translocação nuclear das subunidades p50 e p65 do NF- κ B de forma dependente dos níveis de estrogénio. Pelo contrário, a abstinência alcoólica atenua a translocação nuclear das subunidades do NF- κ B induzida pela alcoolização crónica de modo igualmente dependente da administração de estradiol.

Os resultados obtidos sugerem que:

a. A degradação oxidativa dos lípidos pode ser considerada um factor crucial no desenvolvimento dos danos hepáticos mediante alcoolização crónica e subsequente abstinência.

b. A diminuição da razão GSH/GSSG observada nas fêmeas alcoolizadas e abstinentes pode contribuir marcadamente para a hepatotoxicidade do etanol.

c. O principal regulador anti-apoptótico a nível hepático deverá ser outro que não a proteína Bcl-2, dado que a sua concentração não variou de forma significativa e dependente do tratamento.

d. Uma vez que a libertação do cyt c para o citosol é reconhecida como um dos mecanismos de activação da caspase 3, a ingestão crónica de etanol parece capaz de promover a apoptose pela via intrínseca.

e. A via extrínseca não deverá ser, neste modelo experimental, a principal via associada à apoptose induzida pelo etanol porquanto não se observou correlação entre a concentração de cyt c e a actividade da caspase 3.

f. A abstinência alcoólica parece ser capaz de atenuar parcialmente o estado inflamatório fomentado pela ingestão continuada de etanol.

Em resumo, parece lícito concluir que a abstinência alcoólica prolongada é capaz de, pelo menos em parte, reverter ou atenuar a nível hepático os efeitos deletérios induzidos pelo consumo de etanol. Mais, os estrogénios, apontados como compostos com capacidade antioxidante, parecem influenciar significativamente a acção perniciosa do etanol e representar um factor determinante no agravamento dos danos hepáticos manifestados pelo sexo feminino, o que poderá estar na base da vulnerabilidade aumentada das mulheres para a toxicidade induzida pelo consumo de etanol.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, J.D., Jr., Lauterburg, B.H. & Mitchell, J.R. (1983). **Plasma glutathione and glutathione disulfide in the rat: regulation and response to oxidative stress.** *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 227 (3): 749-754.
- Adrain, C. & Martin, S.J. (2001). **The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas.** *Trends in Biochemical Sciences* 26 (6): 390-397.
- Agarwal, D.P. (2001). **Genetic polymorphisms of alcohol metabolizing enzymes.** *Pathologie-Biologie (Paris)* 49 (9): 703-709.
- Aguiar, A.S., Da-Silva, V.A. & Boaventura, G.T. (2004). **Can calories from ethanol contribute to body weight preservation by malnourished rats?** *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 37 (6): 841-846.
- Albano, E. (2006). **Alcohol, oxidative stress and free radical damage.** *Proceedings of the Nutrition Society* 65: 278-290.
- Anderson, M.E. (1985). **Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples.** *Methods in Enzymology* 113: 548-555.
- Anderson, P. & Baumberg, B. (2006). **Alcohol in Europe: a public health perspective. A report for the European Commission.** Institute of alcohol studies (Reino Unido).
- Arteel, G.E. (2003). **Oxidants and antioxidants in alcohol-induced liver disease.** *Gastroenterology* 124: 778-790.
- Atkinson, H.C. & Waddell, B.J. (1997). **Circadian variation in basal plasma corticosterone and adrenocorticotropin in the rat: sexual dimorphism and changes across the estrous cycle.** *Endocrinology* 138 (9): 3842-3848.
- Badger, T.M., Hoog, J.-O., Svensson, S., McGehee Jr., R.E., Fang, C., Ronis, M.J.J. & Ingelman-Sundberg, M. (2000). **Cyclic expression of class I alcohol dehydrogenase in male rats treated with ethanol.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 274 (3): 684-688.
- Bagetta, G., Chiappetta, O., Amantea, D., Iannone, M., Rotiroti, D., Costa, A., Nappi, G. & Corasaniti, M.T. (2004). **Estradiol reduces cytochrome c translocation and minimizes hippocampal damage caused by transient global ischemia in rat.** *Neuroscience Letters* 368 (1): 87-91.
- Baichwal, V.R. & Baeuerle, P.A. (1997). **Activate NF-kappa B or die?** *Current Biology* 7 (2): R94-R96.
- Bardag-Gorce, F. (2009). **Nuclear effects of ethanol-induced proteasome inhibition in liver cells.** *World Journal of Gastroenterology* 15(10): 1163-1167.

Referências bibliográficas

- Barone, M., Ladisa, R., Di Leo, A., Spano, D., Francioso, D., Aglio, V., Amoroso, A., Francavilla, A. & Iolascon, A. (2006). **Estrogen-induced proliferation in cultured hepatocytes involves cyclin D1, p21(Cip1) and p27(Kip1).** *Digestive Diseases and Sciences* 51 (3): 580-586.
- Baroni, G.S., Marucci, L., Benedetti, A., Mancini, R., Jezequel, A.M. & Orlandi, F. (1994). **Chronic ethanol feeding increases apoptosis and cell proliferation in rat liver.** *Journal of Hepatology* 20 (4): 508-513.
- Bautista, A.P. & Spitzer, J.J. (1999). **Role of Kupffer cells in the ethanol-induced oxidative stress in the liver.** *Frontiers in Bioscience* 4: 589-595.
- Bell, R.L., Rodd, Z.A., Sable, H.J., Schultz, J.A., Hsu, C.C., Lumeng, L., Murphy, J.M. & McBride, W.J. (2006). **Daily patterns of ethanol drinking in peri-adolescent and adult alcohol-preferring (P) rats.** *Pharmacology, Biochemistry & Behavior* 83 (1): 35-46.
- Bogdan, C., Röllinghoff, M. & Diefenbach, A. (2000). **Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity.** *Current Opinion in Immunology* 12: 64-76.
- Borrás, C., Sastre, J., Garcia-Sala, D., Lloret, A., Pallardo, F.V. & Vina, J. (2003). **Mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression and lower oxidative damage than males.** *Free Radical Biology & Medicine* 34 (5): 546-552.
- Bottner, M. & Wuttke, W. (2006). **Chronic treatment with physiological doses of estradiol affects the GH-IGF-1 axis and fat metabolism in young and middle-aged ovariectomized rats.** *Biogerontology* 7 (2): 91-100.
- Bowie, A. & O'Neill, L.A. (2000). **Oxidative stress and nuclear factor-kappaB activation: a reassessment of the evidence in the light of recent discoveries.** *Biochemical Pharmacology* 59 (1): 13-23.
- Bradford, M.M. (1976). **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Brown, G.C. & Borutaite, V. (2008). **Regulation of apoptosis by the redox state of cytochrome c.** *Biochimica et Biophysica Acta* 1777: 877-881.
- Brunelle, J.K. & Letai, A. (2009). **Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family.** *Journal of Cell Science* 122 (Pt 4): 437-441.
- Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X. & Wang, X. (1999). **Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis.** *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 15: 269-290.
- Buemann, B. & Astrup, A. (2001). **How does the body deal with energy from alcohol?** *Nutrition* 17 (7-8): 638-641.
- Bunout, D. (1999). **Nutritional and metabolic effects of alcoholism: their relationship with alcoholic liver disease.** *Nutrition* 15 (7/8): 583-589.

- Cadete Leite, A. (1988). **Efeitos da alcoolização crônica e da abstinência sobre a formação do hipocampo e o córtex prélimbico do rato adulto. Estudo morfométrico.** Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina da Universidade do Porto.
- Cardin, R., D'Errico, A., Fiorentino, M., Cecchetto, A., Naccarato, R. & Farinati, F. (2002). **Hepatocyte proliferation and apoptosis in relation to oxidative damage in alcohol-related liver disease.** *Alcohol & Alcoholism* 37 (1): 43-48.
- Cederbaum, A.I. (2001). **Alcohol, oxidative stress and cell injury.** *Free Radical Biology & Medicine* 31 (12): 1524-1526.
- Chen, C.C. & Yin, S.J. (2008). **Alcohol abuse and related factors in Asia.** *International Review of Psychiatry* 20 (5): 425-433.
- Circu, M.L. & Aw, T.Y. (2008). **Glutathione and apoptosis.** *Free Radical Research* 42 (8): 689-706.
- Clark, J.W., Fixaris, M.C., Belanger, G.V. & Rosenwasser, A.M. (2007). **Repeated light-dark phase shifts modulate voluntary ethanol intake in male and female high alcohol-drinking (HAD1) rats.** *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 31 (10): 1699-1706.
- Colantoni, A., La Paglia, N., De Maria, N., Emanuele, M.A., Emanuele, N.V., Idilman, R., Harig, J. & Van Thiel, D.H. (2000). **Influence of sex hormonal status on alcohol-induced oxidative injury in male and female rat liver.** *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 24 (9): 1467-1473.
- Comporti, M. (1998). **Lipid peroxidation and biogenic aldehydes: from the identification of 4-hydroxynonenal to further achievements in biopathology.** *Free Radical Research* 28 (6): 623-635.
- Crippens, D., White, M.L., George, M.A., Jaworski, J.N., Brunner, L.J., Lancaster, F.E. & Gonzales, R.A. (1999). **Gender differences in blood levels, but not brain levels, of ethanol in rats.** *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 23 (3): 414-420.
- Cunha, H., Filho (2005). **Necessidades de intervenção no consumo de álcool, tabaco e outras drogas em Portugal.** *Revista Portuguesa de Saúde Pública* 23 (2): 77-88.
- Czaja, M.J. (2007). **Cell signaling in oxidative stress-induced liver injury.** *Seminars in Liver Disease* 27 (4): 378-389.
- Das, S.K. & Vasudevan, D.M. (2005). **Effect of ethanol on liver antioxidant defense systems: a dose dependent study.** *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 20 (1): 80-84.
- Das, S.K. & Vasudevan, D.M. (2007). **Alcohol-induced oxidative stress.** *Life Sciences* 81 (3): 177-187.
- de la Monte, S.M., Yeon, J.E., Tong, M., Longato, L., Chaudhry, R., Pang, M.Y., Duan, K. & Wands, J.R. (2008). **Insulin resistance in experimental alcohol-induced liver disease.** *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 23 (8 Pt 2): 477-486.
- Deaciuc, I.V., Fortunato, F., D'Souza, N.B., Hill, D.B., Schmidt, J., Lee, E.Y. & McClain, C.J. (1999). **Modulation of caspase-3 activity and Fas ligand mRNA expression in rat**

- liver cells in vivo by alcohol and lipopolysaccharide.** *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 23 (2): 349-356.
- Deaciuc, I.V., Fortunato, F., D'Souza, N.B., Hill, D.B. & McClain, C.J. (2001a). **Chronic alcohol exposure of rats exacerbates apoptosis in hepatocytes and sinusoidal endothelial cells.** *Hepatology Research* 19 (3): 306-324.
- Deaciuc, I.V., D'Souza, N.B., de Villiers, W.J., Burikhanov, R., Sarphie, T.G., Hill, D.B. & McClain, C.J. (2001b). **Inhibition of caspases in vivo protects the rat liver against alcohol-induced sensitization to bacterial lipopolysaccharide.** *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 25 (6): 935-943.
- Deaciuc, I.V., D'Souza, N.B., Burikhanov, R., Nasser, M.S., Voskresensky, I.V., De Villiers, W.J. & McClain, C.J. (2004). **Alcohol, but not lipopolysaccharide-induced liver apoptosis involves changes in intracellular compartmentalization of apoptotic regulators.** *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 28 (1): 160-172.
- Dettling, A., Fisher, F., Böhrer, S., Ulrichs, F., Skopp, G., Graw, M. & Haffner, H.-T. (2007). **Ethanol elimination rates in men and women in consideration of the calculated liver weight.** *Alcohol* 41: 415-420.
- Dettling, A., Skopp, G., Graw, M. & Haffner, H.-T. (2008). **The influence of sex hormones on the elimination kinetics of ethanol.** *Forensic Science International* 177: 85-89.
- Dey, A. & Cederbaum, A.I. (2006). **Alcohol and oxidative liver injury.** *Hepatology* 43 (2, suppl.1): 63-74.
- Dinis-Oliveira, R.J., Sousa, C., Remião, F., Duarte, J.A., Ferreira, R., Sánchez Navarro, A., Bastos, M.L. & Carvalho, F. (2007). **Sodium salicylate prevents paraquat-induced apoptosis in the rat lung.** *Free Radical Biology & Medicine* 43 (1): 48-61.
- Donohue Jr., T.M. (2007). **Alcohol-induced steatosis in liver cells.** *World Journal of Gastroenterology* 13 (37): 4974-4978.
- Ellis, F.W. (1966). **Effect of ethanol on plasma corticosterone levels.** *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 153 (1): 121-127.
- Ferreira Seiva, F.R., Amauchi, J.F., Ribeiro Rocha, K.K., Souza, G.A., Ebaid, G.X., Burneiko, R.M. & Novelli, E.L. (2009). **Effects of N-acetylcysteine on alcohol abstinence and alcohol-induced adverse effects in rats.** *Alcohol* 43 (2): 127-135.
- Figueiredo, H.F., Ulrich-Lai, Y.M., Choi, D.C. & Herman, J.P. (2007). **Estrogen potentiates adrenocortical responses to stress in female rats.** *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 292: 1173-1182.
- Ford, M.M., Eldridge, J.C. & Samson, H.H. (2004). **Determination of an estradiol dose-response relationship in the modulation of ethanol intake.** *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 28 (1): 20-28.
- Froy, O. (2007). **The relationship between nutrition and circadian rhythms in mammals.** *Frontiers in Neuroendocrinology* 28 (2-3): 61-71.

- Garrido, C., Galluzzi, L., Brunet, M., Puig, P.E., Didelot, C. & Kroemer, G. (2006). **Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria.** *Cell Death and Differentiation* 13: 1423-1433.
- Gemma, S., Vichi, S. & Testai, E. (2006). **Individual susceptibility and alcohol effects: biochemical and genetic aspects.** *Annali dell' Istituto Superiore di Sanità* 42 (1): 8-16.
- Gerard-Monnier, D. & Chaudiere, J. (1996). **Metabolism and antioxidant function of glutathione.** *Pathologie-Biologie (Paris)* 44 (1): 77-85.
- Grune, T., Reinheckel, T. & Davies, K.J. (1997). **Degradation of oxidized proteins in mammalian cells.** *The FASEB Journal* 11: 526-534.
- Guicciardi, M.E. & Gores, G.J. (2005). **Apoptosis: a mechanism of acute and chronic liver injury.** *Gut* 54 (7): 1024-1033.
- Gutteridge, J.M.C. (1981). **Thiobarbituric acid-reactivity following iron-dependent free-radical damage to amino acids and carbohydrates.** *FEBS Letters* 128 (2): 343-346.
- Gutteridge, J.M. & Halliwell, B. (1990). **The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems.** *Trends in Biochemical Sciences* 15 (4): 129-135.
- Han, D., Hanawa, N., Saberi, B. & Kaplowitz, N. (2006). **Mechanisms of liver injury. Role of glutathione redox status in liver injury.** *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 291: 1-7.
- Harris, M.H. & Thompson, C.B. (2000). **The role of the Bcl-2 family in the regulation of outer mitochondrial membrane permeability.** *Cell Death and Differentiation* 7: 1182-1191.
- Heilbronn, L.K., de Jonge, L., Frisard, M.I., DeLany, J.P., Larson-Meyer, D.E., Rood, J., Nguyen, T., Martin, C.K., Volaufova, J., Greenway, F.L., Smith, S.R., Deutsch, W.A., Williamson, D.A. & Ravussin, E. (2006). **Effect of 6-month calorie restriction on biomarkers of longevity, metabolic adaptation, and oxidative stress in overweight individuals.** *The Journal of the American Medical Association* 295 (13): 1539-1548.
- Hentze, H., Gantner, F., Kolb, S.A. & Wendel, A. (2000). **Depletion of hepatic glutathione prevents death receptor-dependent apoptotic and necrotic liver injury in mice.** *The American Journal of Pathology* 156 (6): 2045-2056.
- Higuchi, H., Kurose, I., Kato, S., Miura, S. & Ishii, H. (1996). **Ethanol-induced apoptosis and oxidative stress in hepatocytes.** *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 20 (S9): 340-346.
- Hoek, J.B. & Pastorino, J.G. (2002). **Ethanol, oxidative stress, and cytokine-induced liver cell injury.** *Alcohol* 27: 63-68.
- Iimuro, Y., Frankenberg, M.V., Arteel, G.E., Bradford, B.U., Wall, C.A. & Thurman, R.G. (1997). **Female rats exhibit greater susceptibility to early alcohol-induced liver injury than males.** *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology.* 35: 1186-1194.
- Ikejima, K., Enomoto, N., Iimuro, Y., Ikejima, A., Fang, D., Xu, J., Forman, D.T., Benner, D.A. & Thurman, R.G. (1998). **Estrogen increases sensitivity of hepatic Kupffer cells to**

- endotoxin**. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*. 37: 669-676.
- Jaeschke, H., Gores, G.J., Cederbaum, A.I., Hinson, J.A., Pessayre, D. & Lemasters, J.J. (2002). **Mechanisms of hepatotoxicity**. *Toxicological Sciences* 65: 166-176.
- Järveläinen, H.A., Fang, C., Ingelman-Sundberg, M., Lukkari, T.A., Sippel, H. & Lindros, K.O. (2000). **Kupffer cells inactivation alleviates ethanol-induced steatosis and CYP2E1 induction but not inflammatory responses in rat liver**. *Journal of Hepatology* 32: 900-910.
- Jiang, Z., Liu, Y., Savas, L., Smith, L., Bonkovsky, H., Baker, S. & Banner, B. (1997). **Frequency and distribution of DNA fragmentation as a marker of cell death in chronic liver diseases**. *Virchows Archiv* 431 (3): 189-194.
- Jiang, X. & Wang, X. (2004). **Cytochrome C-mediated apoptosis**. *Annual Review of Biochemistry* 73: 87-106.
- Judge, S., Judge, A., Grune, T. & Leeuwenburgh, C. (2004). **Short-term CR decreases cardiac mitochondrial oxidant production but increases carbonyl content**. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 286: 254-259.
- Jung, M.E., Agarwal, R. & Simpkins, J.W. (2007). **Ethanol withdrawal posttranslationally decreases the activity of cytochrome c oxidase in an estrogen reversible manner**. *Neuroscience Letters* 416: 160-164.
- Kalsi, G., Prescott, C.A., Kendler, K.S. & Riley, B.P. (2009). **Unraveling the molecular mechanisms of alcohol dependence**. *Trends in Genetics* 25 (1): 49-55.
- Karinch, A.M., Martin, J.H. & Vary, T.C. (2008). **Acute and chronic ethanol consumption differentially impact pathways limiting hepatic protein synthesis**. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 295: 3-9.
- Kasdallah-Grissa, A., Mornagui, B., Aouani, E., Hammami, M., Gharbi, N., Kamoun, A. & El-Fazaa, S. (2006). **Protective effect of resveratrol on ethanol-induced lipid peroxidation in rats**. *Alcohol & Alcoholism* 41 (3): 236-239.
- Kiray, M., Ergur, B.U., Bagriyanik, A., Pekcetin, C., Aksu, I. & Buldan, Z. (2007). **Suppression of apoptosis and oxidative stress by deprenyl and estradiol in aged rat liver**. *Acta Histochemica* 109 (6): 480-485.
- Kluck, R.M., Bossy-Wetzel, E., Green, D.R. & Newmeyer, D.D. (1997). **The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis**. *Science* 275 (5303): 1132-1136.
- Kohnke, M.D. (2008). **Approach to the genetics of alcoholism: a review based on pathophysiology**. *Biochemical Pharmacology* 75 (1): 160-177.
- Koirala, B., Alele, P.E. & Devaud, L.L. (2008). **Influence of hormonal status on behavioral responses to an acute ethanol challenge during ethanol withdrawal in male and female rats**. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 90 (4): 691-700.

- Kono, H., Wheeler, M.D., Rusyn, I., Min, L., Seabra, V., Rivera, C.A., Bradford, B.U., Forman, D.T. & Thurman, R.G. (2000). **Gender differences in early alcohol-induced liver injury: role of CD14, NF- κ B, and TNF- α .** *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 278: 652-661.
- Lambert, J.C., Zhou, Z. & Kang, Y.J. (2003). **Suppression of Fas-mediated signalling pathway is involved in zinc inhibition of ethanol-induced liver apoptosis.** *Experimental Biology and Medicine* 228: 406-412.
- Lee, Y. & Shacter, E. (1995). **Role of carbohydrates in oxidative modification of fibrinogen and other plasma proteins.** *Archives of Biochemistry and Biophysics* 321 (1): 175-181.
- Lefèvre, G., Beljean-Leymarie, M., Beyerle, F., Bonnefont-Rousselot, D., Cristol, J.P., Therond, P. & Torreilles, J. (1998). **Evaluation of lipid peroxidation by measuring thiobarbituric acid reactive substances.** *Annales de Biologie Clinique* 56 (3): 305-319.
- Levine, R.L., Williams, J.A., Stadtman, E.R. & Shacter, E. (1994). **Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins.** *Methods in Enzymology* 233: 346-357.
- Li, N. & Karin, M. (1999). **Is NF- κ B the sensor for oxidative stress?** *The FASEB Journal* 13: 1137-1143.
- Li, T.K. (2008). **Quantifying the risk for alcohol-use and alcohol-attributable health disorders: present findings and future research needs.** *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 23 (suppl.1): S2-S8.
- Lieber, C.S. (1997). **Ethanol metabolism, cirrhosis and alcoholism.** *Clinica Chimica Acta* 257: 59-84.
- Lieber, C.S. (1999). **Microsomal ethanol-oxidizing system (MEOS): the first 30 years (1968-1998) – A review.** *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 23 (6): 991-1007.
- Lieber, C.S. (2000). **Alcohol and the liver: metabolism of alcohol and its role in hepatic and extrahepatic diseases.** *The Mount Sinai Journal of Medicine* 67 (1): 84-94.
- Ling, P.R. & Bistrian, B.R. (2009). **Comparison of the effects of food versus protein restriction on selected nutritional and inflammatory markers in rats.** *Metabolism Clinical and Experimental* 58 (6): 835-842.
- Liu, J., Yeo, H.C., Doniger, S.J. & Ames, B.N. (1997). **Assay of aldehydes from lipid peroxidation: gas chromatography-mass spectrometry compared to thiobarbituric acid.** *Analytical Biochemistry* 245: 161-166.
- Liu, Y., Shimizu, I., Omoya, T., Ito, S., Gu, X.S. & Zuo, J. (2002). **Protective effect of estradiol on hepatocytic oxidative damage.** *World Journal of Gastroenterology* 8 (2): 363-366.
- Liu, L.-G., Yan, H., Yao, P., Zhang, W., Zou, L.-J., Song, F.-F., Li, K. & Sun, X.-F. (2005). **CYP2E1-dependent hepatotoxicity and oxidative damage after ethanol administration in human primary hepatocytes.** *World Journal of Gastroenterology* 11 (29): 4530-4535.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951). **Protein measurement with folin phenol reagent.** *The Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275.

Referências bibliográficas

- Macho, L., Zorad, S., Radikova, Z., Patterson-Buckedahl, P. & Kvetnansky, R. (2003). **Ethanol consumption affects stress response and insulin binding in tissues of rats.** *Endocrine Regulations* 37 (4): 195-202.
- Madeira, M.D., Andrade, J.P., Lieberman, A.R., Sousa, N., Almeida, O.F. & Paula-Barbosa, M.M. (1997). **Chronic alcohol consumption and withdrawal do not induce cell death in the suprachiasmatic nucleus, but lead to irreversible depression of peptide immunoreactivity and mRNA levels.** *The Journal of Neuroscience* 17 (4): 1302-1319.
- Maher, J.J. (1998). **Comments (How does estrogen enhance endotoxin toxicity? Let me count the ways).** *Hepatology* 28 (6): 1720-1721.
- Mezey, E. (2000). **Influence of sex hormones on alcohol metabolism.** *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 24 (4): 421.
- Miura, T., Muraoka, S. & Ogiso, T. (1996). **Inhibition of lipid peroxidation by estradiol and 2-hydroxyestradiol.** *Steroids* 61 (6): 379-383.
- Morel, Y. & Barouki, R. (1999). **Repression of gene expression by oxidative stress.** *The Biochemical Journal* 342 (Pt 3): 481-496.
- Mukherjee, S., Kumar Das, S. & Vasudevan, D.M. (2007). **Effects of ethanol consumption on different organs - a brief overview.** *Asian Journal of Biochemistry* 2 (6): 386-394.
- Nagy, L.E. (2003). **Recent insights into the role of the innate immune system in the development of alcoholic liver disease.** *Experimental Biology and Medicine (Maywood)* 228 (8): 882-890.
- Nagy, L.E. (2004). **Molecular aspects of alcohol metabolism: transcription factors involved in early ethanol-induced liver injury.** *Annual Review of Nutrition* 24: 55-78.
- Nanji, A.A., Jokelainen, K., Fotouhinia, M., Rahemtulla, A., Thomas, P., Tipoe, G.L., Su, G.L. & Dannenberg, A.J. (2002). **Increased severity of alcoholic liver injury in female rats: role of oxidative stress, endotoxin, and chemokines.** *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 281: 1348-1356.
- Norberg, A., Jones, A.W., Hahn, R.G. & Gabrielsson, J.L. (2003). **Role of variability in explaining ethanol pharmacokinetics: research and forensic applications.** *Clinical Pharmacokinetics* 42 (1): 1-31.
- Ogilvie, K.M. & Rivier, C. (1997). **Gender difference in hypothalamic-pituitary-adrenal axis response to alcohol in the rat: activational role of gonadal steroids.** *Brain Research* 766 (1-2): 19-28.
- Oh, S.I., Kim, C.I., Chun, H.J. & Park, S.C. (1998). **Chronic ethanol consumption affects glutathione status in rat liver.** *The Journal of Nutrition* 128 (4): 758-763.
- Peoples, R.W., Li, C. & Weight, F.F. (1996). **Lipid vs protein theories of alcohol action in the nervous system.** *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 36: 185-201.
- Peron, F.G. (1960). **The isolation and identification of some adrenocorticosteroids released by rat adrenal tissue incubated in vitro.** *Endocrinology* 66: 458-469.

- Porter, A.G. & Janicke, R.U. (1999). **Emerging roles of caspase-3 in apoptosis.** *Cell Death and Differentiation* 6 (2): 99-104.
- Pushpakiran, G., Mahalakshmi, K. & Anuradha, C.V. (2004). **Taurine restores ethanol-induced depletion of antioxidants and attenuates oxidative stress in rat tissues.** *Amino Acids* 27 (1): 91-96.
- Reznick, A.Z. & Packer, L. (1994). **Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay.** *Methods in Enzymology* 233: 357-363.
- Rivier, C. (1993). **Female rats release more corticosterone than males in response to alcohol: influence of circulating sex steroids and possible consequences for blood alcohol levels.** *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 17 (4): 854-859.
- Room, R. (2006). **International control of alcohol: alternative paths forward.** *Drug and Alcohol Review* 25 (6): 581-595.
- Rouach, H., Fataccioli, V., Gentil, M., French, S.W., Morimoto, M. & Nordmann, R. (1997). **Effect of chronic ethanol feeding on lipid peroxidation and protein oxidation in relation to liver pathology.** *Hepatology* 25 (2): 351-355.
- Rover, L., Jr., Kubota, L.T. & Hoehr, N.F. (2001). **Development of an amperometric biosensor based on glutathione peroxidase immobilized in a carbodiimide matrix for the analysis of reduced glutathione from serum.** *Clinica Chimica Acta* 308 (1-2): 55-67.
- Roy, A.K. & Chatterjee, B. (1983). **Sexual dimorphism in the liver.** *Annual Review of Physiology* 45: 37-50.
- Salaspuro, M.P., Shaw, S., Jayatilleke, E., Ross, W.A. & Lieber, C.S. (1981). **Attenuation of the ethanol-induced hepatic redox change after chronic alcohol consumption in baboons: metabolic consequences in vivo and in vitro.** *Hepatology* 1 (1): 33-38.
- Santos-Marques, M.J., Carvalho, F., Sousa, C., Remião, F., Vitorino, R., Amado, F., Ferreira, R., Duarte, J.A. & Bastos, M.L. (2006). **Cytotoxicity and cell signalling induced by continuous mild hyperthermia in freshly isolated mouse hepatocytes.** *Toxicology Letters* 224 (3): 210-218.
- Schenker, S. (1997). **Medical consequences of alcohol abuse: is gender a factor?** *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 21 (1): 179-181.
- Schoonbroodt, S. & Piette, J. (2000). **Oxidative stress interference with the nuclear factor-kappa B activation pathways.** *Biochemical Pharmacology* 60 (8): 1075-1083.
- Schug, Z.T. & Gottlieb, E. (2009). **Cardiolipin acts as a mitochondrial signalling platform to launch apoptosis.** *Biochimica et Biophysica Acta*.
- Schwartz, J.B. (2003). **The influence of sex in pharmacokinetics.** *Clinical Pharmacokinetics* 42 (2): 107-121.
- Seeley, R.J., Hawkins, M.H., Ramsay, D.S., Wilkinson, C.W. & Woods, S.C. (1996). **Learned tolerance to the corticosterone-increasing action of ethanol in rats.** *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 55 (2): 268-273.

- Silva, S.M., Santos-Marques, M.J. & Madeira M.D. (2009) **Sexually dimorphic response of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis to chronic alcohol consumption and withdrawal.** *Brain Research* 1303: 61-73.
- Singh, A.K. & Jiang, Y. (2004). **Differential activation of NF kappa B/RelA-p50 and NF kappa B/p50-p50 in control and alcohol-drinking rats subjected to carrageenin-induced pleurisy.** *Mediators of Inflammation* 13 (4): 255-262.
- Sipp, T.L., Blank, S.E., Lee, E.G. & Meadows, G.G. (1993). **Plasma corticosterone response to chronic ethanol consumption and exercise stress.** *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 204 (2): 184-190.
- Sitte, N., Merker, K. & Grune, T. (1998). **Proteasome-dependent degradation of oxidized proteins in MRC-5 fibroblasts.** *FEBS Letters* 440: 399-402.
- Slee, E.A., Adrain, C. & Martin, S.J. (2001). **Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis.** *The Journal of Biological Chemistry* 276 (10): 7320-7326.
- Soderberg, B.L., Salem, R.O., Best, C.A., Cluette-Brown, J.E. & Laposata, M. (2003). **Ethanol metabolites that reflect ethanol intake.** *American Journal of Clinical Pathology* 119 (suppl.1): 94-99.
- Solberg, L.C., Olson, S.L., Turek, F.W. & Redei, E. (2001). **Altered hormone levels and circadian rhythm of activity in the WKY rat, a putative animal model of depression.** *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 281 (3): 786-794.
- Spolarics, Z. (1998). **Endotoxemia, pentose cycle, and the oxidant/antioxidant balance in the hepatic sinusoid.** *Journal of Leukocyte Biology* 63: 534-541.
- Stadtman, E.R. (1993). **Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions.** *Annual Review of Biochemistry* 62: 797-821.
- Stamp, J.A., Mashoodh, R., van Kampen, J.M. & Robertson, H.A. (2008). **Food restriction enhances peak corticosterone levels, cocaine-induced locomotor activity, and Δ FosB expression in the nucleus accumbens of the rat.** *Brain Research* 1204: 94-101.
- Straub, R.H. (2007). **The complex role of estrogens in inflammation.** *Endocrine Reviews* 28 (5): 521-574.
- Strbak, V., Benicky, J., Macho, L., Jezova, D. & Nikodemova, M. (1998). **Four-week ethanol intake decreases food intake and body weight but does not affect plasma leptin, corticosterone, and insulin levels in pubertal rats.** *Metabolism* 47 (10): 1269-1273.
- Sutker, P.B., Goist Jr., K.C. & King, A.R. (1987). **Acute ethanol intoxication in women: relationship to dose and menstrual cycle phase.** *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 11 (1): 74-79.
- Tadic, S.D., Elm, M.S., Li, H.S., Van Londen, G.J., Subbotin, V.M., Whitcomb, D.C. & Eagon, P.K. (2002). **Sex differences in hepatic gene expression in a rat model of ethanol-induced liver injury.** *Journal of Applied Physiology* 93 (3): 1057-1068.

- Tang, D.G., Li, L., Zhu, Z. & Joshi, B. (1998). **Apoptosis in the absence of cytochrome c accumulation in the cytosol.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 242 (2): 380-384.
- Tavares, M.A.D.F. (1985). **Alcoolização crônica e circuito cerebeloso do rato adulto. Estudo morfométrico.** Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina da Universidade do Porto.
- Teare, J.P., Greenfield, S.M., Watson, D., Punchard, N.A., Miller, N., Rice-Evans, C.A. & Thompson, R.P. (1994). **Lipid peroxidation in rats chronically fed ethanol.** *Gut* 35 (11): 1644-1647.
- Thannickal, V.J. & Fanburg, B.L. (2000). **Reactive oxygen species in cell signaling.** *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 279 (6): 1005-1028.
- Thomasson, H. (2000). **Alcohol elimination: faster in women?** . *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 24 (4): 419-420.
- Thurman, R.G. (1998). **Mechanisms of hepatic toxicity. II. Alcoholic liver injury involves activation of Kupffer cells by endotoxin.** *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 38: 605-611.
- Thurman, R.G., Bradford, B.U., Iimuro, Y., Frankenberg, M.V., Knecht, K.T., Connor, H.D., Adachi, Y., Wall, C., Arteel, G.E., Raleigh, J.A., Forman, D.T. & Mason, R.P. (1999). **Mechanisms of alcohol-induced hepatotoxicity: studies in rats.** *Frontiers in Bioscience* 4: 42-46.
- Tipoe, G.L., Liong, E.C., Casey, C.A., Donohue, T.M., Jr., Eagon, P.K., So, H., Leung, T.M., Fogt, F. & Nanji, A.A. (2008). **A voluntary oral ethanol-feeding rat model associated with necroinflammatory liver injury.** *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 32 (4): 669-682.
- Tripathi, P. & Aggarwal, A. (2006). **NF- κ B transcription factor: a key player in the generation of immune response.** *Current Science* 90 (4): 519-531.
- Tsujimoto, Y. (2003). **Cell death regulation by the Bcl-2 protein family in the mitochondria.** *Journal of Cellular Physiology* 195 (2): 158-167.
- Tsukamoto, H., French, S.W., Benson, N., Delgado, G., Rao, G.A., Larkin, E.C. & Largman, C. (1985). **Severe and progressive steatosis and focal necrosis in rat liver induced by continuous intragastric infusion of ethanol and low fat diet.** *Hepatology* 5 (2): 224-232.
- Tsukamoto, H. & Lu, S.C. (2001). **Current concepts in the pathogenesis of alcoholic liver injury.** *The FASEB Journal* 15 (8): 1335-1349.
- Tuyns, A.J. & Pequignot, G. (1984). **Greater risk of ascitic cirrhosis in females in relation to alcohol consumption.** *International Journal of Epidemiology* 13 (1): 53-57.
- Uchida, K. & Stadtman, E.R. (1992). **Modification of histidine residues in proteins by reaction with 4-hydroxynonenal.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (10): 4544-4548.

Referências bibliográficas

- Valle, A., Guevara, R., Garcia-Palmer, F.J., Roca, P. & Oliver, J. (2007). **Sexual dimorphism in liver mitochondrial oxidative capacity is conserved under caloric restriction conditions.** *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 293 (4): 1302-1308.
- Vandeputte, C., Guizon, I., Genestie-Denis, I., Vannier, B. & Lorenzon, G. (1994). **A microtiter plate assay for total glutathione and glutathione disulfide contents in cultured/isolated cells: performance study of a new miniaturized protocol.** *Cell Biology and Toxicology* 10 (5-6): 415-421.
- Viau, V. & Meaney, M.J. (1991). **Variations in the hypothalamic-pituitary-adrenal response to stress during the estrous cycle in the rat.** *Endocrinology* 129 (5): 2503-2511.
- Vina, J., Sastre, J., Pallardo, F.V., Gambini, J. & Borras, C. (2006). **Role of mitochondrial oxidative stress to explain the different longevity between genders. Protective effect of estrogens.** *Free Radical Research* 40 (12): 1359-1365.
- Yacoub, L.K., Fogt, F., Griniuvienė, B. & Nanji, A.A. (1995). **Apoptosis and bcl-2 protein expression in experimental alcoholic liver disease in the rat.** *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 19 (4): 854-859.
- Yamashina, S., Takei, Y., Ikejima, K., Enomoto, N., Kitamura, T. & Sato, N. (2005). **Ethanol-induced sensitization to endotoxin in Kupffer cells is dependent upon oxidative stress.** *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 29 (12): 246-250.
- Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C.N., Ibrado, A.M., Cai, J., Peng, T.I., Jones, D.P. & Wang, X. (1997). **Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked.** *Science* 275 (5303): 1129-1132.
- Yin, M., Ikejima, K., Wheeler, M.D., Bradford, B.U., Seabra, V., Forman, D.T., Sato, N. & Thurman, R.G. (2000). **Estrogen is involved in early alcohol-induced liver injury in a rat enteral feeding model.** *Hepatology* 31 (1): 117-123.
- Zhou, Z., Sun, X. & Kang, Y.J. (2001). **Ethanol-induced apoptosis in mouse liver: Fas- and cytochrome c-mediated caspase-3 activation pathway.** *American Journal of Pathology* 159 (1): 329-338.