

**JOEL ANTONIO BERNHARDT**

**EFEITO DA CASTRAÇÃO PÓS-NATAL SOBRE A  
MORTALIDADE NA SEPSE EM RATOS**



03514200

**CONSULTA LOCAL**

**FLORIANÓPOLIS, SC  
2002**

**JOEL ANTONIO BERNHARDT**

**EFEITO DA CASTRAÇÃO PÓS-NATAL SOBRE A  
MORTALIDADE NA SEPSE EM RATOS**

**Dissertação apresentada à Universidade  
Federal de Santa Catarina, para obtenção  
do Título de Mestre em Ciências Médicas.**

**COORDENADOR: Prof. Armando José d'Acampora, MD, PhD  
ORIENTADOR: Prof. Armando José d'Acampora, MD, PhD  
CO-ORIENTADOR: Prof. Ricardo Tramonte, MD, PhD**

**FLORIANÓPOLIS, SC  
2002**

Bernhardt, Joel Antonio.

Efeito da castração pós-natal sobre a mortalidade na sepse em ratos.  
Florianópolis, 2002.

50p.

Orientador: Prof. Armando José d'Acampora, M.D., Ph.D.

Co-orientador: Prof. Ricardo Tramonte, M.D., Ph.D.

Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Santa Catarina – Curso de  
Mestrado em Ciências Médicas.

1. Sepse 2. Dimorfismo sexual 3. Testosterona

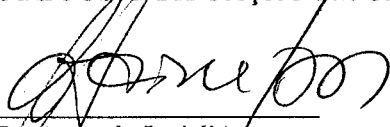


**Universidade Federal de Santa Catarina**  
**Centro de Ciências da Saúde**  
**Mestrado em Ciências Médicas**

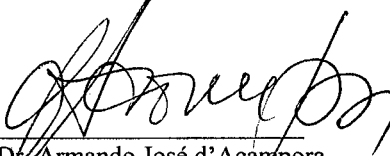
  
\_\_\_\_\_  
**JOEL ANTONIO BERNHARDT**

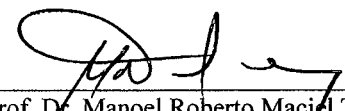
ESSA DISSERTAÇÃO FOI JULGADA ADEQUADA PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE  
**MESTRE EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

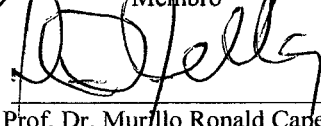
COM ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM **CLÍNICA CIRÚRGICA** E APROVADA EM SUA  
FORMA FINAL PELO PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS.


  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Armando José d'Acampora  
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Armando José d'Acampora  
Orientador

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Manoel Roberto Maciel Trindade  
Membro

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Murillo Ronald Capella  
Membro

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Tânia Fröde  
Membro

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Jorge Bins Ely  
Membro

Florianópolis, 14 de junho de 2002.





## ***DEDICATÓRIA***

*Aos meus pais, pela visão de que a formação escolar seria o melhor caminho, mesmo há tanto tempo e naquele longínquo interior, por terem sabido sacrificar seus interesses em prol disso e por terem acreditado que eu chegaria até aqui.*

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador professor ARMANDO JOSÉ d'ACAMPORA, MD, PhD, e ao professor RICARDO TRAMONTE, biomédico, PhD, co-orientador, meu muito obrigado pelo incentivo, pelos ensinamentos, pela paciência, pelo bom humor e apoio durante todo o tempo do Mestrado.

À CLÁUDIA, minha esposa pela parceria neste mestrado, pelo apoio e sacrifício com minhas ausências constantes.

Às minhas filhas PAULA e THAÍS. Não existe dissertação sem sacrifícios de alguém. Vocês souberam compreender isso.

Ao acadêmico JOÃO DANIEL MAY SERAFIM pela ajuda no experimento.

Ao Dr. JOÃO CARLOS XIKOTA, MD, MSc e TÂNIA SÍLVIA FRÖDE, Bioquímica, PhD, pelas discussões sobre a dissertação e auxílio na revisão.

Ao LUIZ HENRIQUE PRAZERES, pela significativa ajuda prestada no laboratório da TOCE em meses de trabalho de pesquisa.

Aos colaboradores do curso de Mestrado, TÂNIA REGINA TAVARES, IVO SOARES e SIMONE NUNES pelo auxílio constante em todas as etapas do curso

À professora SÍLVIA MODESTO NASSAR, engenheira, PhD, e ANA LUIZA HALAL, pela análise estatística.

Ao CHARLES VEIGA, técnico da Disciplina de Técnica Operatória por ter cuidado bem dos animais.

Aos colegas alunos do Mestrado pelo bom convívio, troca de informações e experiências neste período.

Aos professores do curso do Mestrado pela grande colaboração na minha formação teórica.

Aos funcionários do Biotério Central da UFSC, e em especial a sua diretora, JOANÉSIA MARIA JUNKES ROTSTEIN, pela colaboração no fornecimento dos animais para a pesquisa.

# ÍNDICE

<b>RESUMO.....</b>	<b>vi</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>vii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>8</b>
<b>2. OBJETIVO.....</b>	<b>12</b>
<b>3. MÉTODO.....</b>	<b>13</b>
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>26</b>
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>30</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>40</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>41</b>
<b>NORMAS ADOTADAS.....</b>	<b>45</b>
<b>APÊNDICE.....</b>	<b>46</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>49</b>

## RESUMO

**Introdução:** Estudos clínicos e experimentais demonstram que a resposta imune à sepse é dimórfica, com fêmeas exibindo uma melhor resposta e uma maior sobrevivência. Os esteróides sexuais estão envolvidos nesta diferença, e sua influência é determinada em períodos críticos da diferenciação sexual dos mamíferos. Para avaliar a influência da castração em períodos precoces do desenvolvimento de ratos, na sobrevivência a sepse aguda experimental quando adultos, desenvolveu-se este estudo. **Método:** Utilizou-se quatro grupos de 10 ratos Wistar divididos entre machos (GM), fêmeas (GF), machos castrados no quarto dia de vida (GMC) e machos castrados no quarto dia de vida com reposição de testosterona (GMCR). A sepse foi induzida por ligadura e perfuração cecal na vida adulta.

**Resultados:** A análise do óbito até 24 horas da indução da sepse mostrou maior mortalidade entre os GM e GMCR em relação aos grupos GMC e GF ( $p=0.0180$ ). A análise de correspondência múltipla (ACM) indica uma associação entre si dos GM e GMCR para o óbito em 24 horas, assim como uma relação entre si dos GF e GMC para a ausência de óbito e o óbito até 24 horas. A análise estatística da curva de sobrevivência de Kaplan-Meier pelo *log-rank* demonstra diferença significativa entre os quatro grupos ( $p=0,0055$ ), e entre GM e GF ( $p=0,0005$ ).

**Conclusão:** Os dados sugerem uma maior sobrevivência à sepse em 24 horas dos grupos GF e GMC, e a presença ou ausência de testosterona em períodos precoces da vida pós-natal seria responsável por este achado.

## SUMMARY

**Introduction:** Experimental and clinical studies demonstrate that immune response to sepsis is dimorphic, with females exhibiting a better response and longer survival. Sexual steroids are involved in this difference and their influence would be determined in critical periods of sexual differentiation. This study was carried out in order to assess the influence of castration in early periods of development, in survival to experimental acute sepsis.

**Method:** Four groups of 10 (ten) Wistar rats each were used consisting of males (M), females (F), males castrated on the fourth day of life (CM) and males castrated on the fourth day of life with testosterone reposition (CMR). Sepsis was induced by ligature and cecal perforation in adult life.

**Results:** The analysis of death until 24 hours of sepsis induction showed greater mortality between the M and the CMR in relation to the CM and F ( $p=0.0180$ ) groups. Multiple correspondence analysis (MCA) indicates a mutual association between of M and CMR for death within 24 hours as well as a mutual relationship between F and CM for absence of death and death until 24 hours of sepsis induction. Statistical analysis of the survival curve Kaplan-Meier by log-rank demonstrates a significant difference between the four groups ( $p=0,0055$ ) and between M and F ( $p=0,0005$ ).

**Conclusion:** Data suggest a better survival to sepsis in 24 hours of the F and CM groups, the presence or absence of testosterone in early periods of post-natal life being responsible for this result.

# 1. INTRODUÇÃO

A sepse e a síndrome da resposta inflamatória sistêmica são causas comuns de morte em unidades de terapia intensiva <sup>1, 2</sup>, e a morbiletalidade pela doença não tem diminuído nos últimos anos. O tratamento dos pacientes não sofreu modificações significativas, e em muitos casos é apenas de suporte de vida <sup>3, 4</sup>.

Enquanto novas abordagens de tratamento requerem validação de estudos clínicos bem controlados, faz-se necessário a obtenção de dados preliminares em animais antes da utilização de drogas ou equipamentos em humanos.

Alguns resultados de pesquisas experimentais na sepse, têm sido encorajadores, principalmente com a utilização de agentes imunomoduladores e que em muito poderão contribuir para futuras aplicações em ensaios clínicos <sup>5</sup>.

Atualmente está bem caracterizado o conceito que as respostas imunes tanto celular como humoral são bem mais acentuadas nas fêmeas do que nos machos. As fêmeas apresentam uma resposta imune maior após imunização e infecção, maior título de imunoglobulinas e apresentam maior incidência de doenças auto-imunes <sup>6, 7</sup>.

Vários estudos clínicos e experimentais mostraram uma diferença sexual na resposta imunitária e na susceptibilidade ao choque, trauma, sepse <sup>8-10</sup>.

Parte da explicação para este fato, pode ser as diferenças anatômicas e funcionais do sistema nervoso central (SNC), determinadas em períodos precoces do desenvolvimento relacionadas aos esteróides sexuais. Estudos nesta área iniciaram com Stumpf em 1970 <sup>11</sup> com a introdução dos métodos de localização de células no cérebro que captam e concentram esteróides sexuais. O autor determinou áreas no cérebro que concentravam maior quantidade de estrogênios. Concluiu que estas áreas seriam o substrato anatômico para justificar as ações de organização e ativação de comportamentos sexuais diferentes, bem como influências hormonais em relação à maternidade, agressividade, alimentação e modulação de muitas outras funções como controle de temperatura e memória. Portanto, o mapeamento dos

receptores é o primeiro passo para demonstrar que o cérebro é um dos alvos de ação dos esteróides sexuais.

Em 1977 durante o Seminário de Programas de Pesquisa em Neurociências, definiu-se dimorfismo como “a existência de duas formas distintas em uma mesma espécie” e o termo comportamento sexualmente dimórfico como “duas diferentes formas de comportamento exibidas pelos machos e fêmeas”<sup>12</sup>.

No início da década de 80, Grossman<sup>13</sup> demonstrou que o sistema imune sofria influência dos esteróides sexuais. Na mesma época, Besedovsky<sup>14</sup> demonstrou pela primeira vez haver comunicação entre o sistema imune ativado e o Sistema Nervoso Central (SNC), sugerindo que o SNC estava envolvido na resposta imune.

As descobertas acima de conexões funcionais bilaterais entre os sistemas imune e neuroendócrino, da influência dos esteróides sexuais no sistema imune e de que há respostas imunes diferentes entre os sexos (dimorfismo sexual), tornam-se um campo de pesquisa importante a partir daí. Parece melhorar a compreensão do equilíbrio homeostático dos organismos vivos a um desafio séptico.

Estímulos físicos, emocionais e ambientais, incluindo infecções, podem causar dano ao organismo. Uma complexa rede, operando em diversos níveis do sistema nervoso central, coordena alterações metabólicas, comportamentais e endócrinas apropriadas para a restauração da homeostase.

As evidências que o sistema imune e neuroendócrino podem influenciar um ao outro são<sup>15</sup>:

1. Células do sistema imune, endócrino e neural podem expressar receptores para citocinas, hormônios, neurotransmissores e neuropeptídeos.
2. Substâncias imunes e neuroendócrinas coexistem em tecidos linfóide, endócrino e neural.
3. Mediadores endócrinos e neurais podem afetar o sistema imune bem como mediadores imunes podem afetar estruturas endócrinas e neurais.

A interação ocorre através de uma via aferente humoral (citocinas) e via sistema nervoso periférico (nervo vago e sistema simpático), e vias eferentes de modulação do sistema

imune pelo SNC através do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), neural (simpático), vagal eferente, lipopolissacarídeo central, hormônio adrenocorticotrófico, opióides.

Portanto, o SNC participa na modulação da imunidade periférica. As vias neurais transportam informações do SNC para o sistema imune. Esta comunicação existente entre estes dois sistemas corporais ocorre ao longo de toda a vida dos vertebrados, sendo que em períodos críticos do desenvolvimento do SNC, existe a participação ativa de vários hormônios no processo de maturação deste sistema. Um dos hormônios que apresenta uma enorme influência sobre o desenvolvimento do SNC, é sem sombra de dúvida a testosterona que masculiniza o SNC em determinados períodos do seu desenvolvimento.

No rato em desenvolvimento ocorre um único grande pico de testosterona na última parte da gestação e continua até o quinto dia de vida pós-natal, este último período sendo responsável pela masculinização e defeminização do cérebro em desenvolvimento. Isto fica bem demonstrado com manipulações hormonais em períodos precoces do desenvolvimento pós-natal<sup>16-19</sup>. O fenótipo destes animais pode ser modificado independente do sexo genético<sup>20</sup>.

O processo da diferenciação sexual parte de um sexo genético que determinará o sexo gonadal. Este por sua vez, através da ação dos esteróides sexuais atuaria no embrião, no neonato, na puberdade e mesmo na vida adulta determinando o fenótipo. Todo este contexto sofre influência das experiências em contato com o exterior.

A diferenciação sexual do cérebro é um exemplo de um evento hormonal direto, em que a presença ou a ausência da testosterona durante a vida fetal e neonatal leva ao desenvolvimento para duas direções: macho ou fêmea<sup>21</sup>. A conversão de testosterona em estradiol ocorre no cérebro, é particularmente ativa no hipotálamo, sendo o evento chave que conduz a defeminização. Ocorre a programação de grupos de células no SNC para responderem de forma masculina ou feminina na vida adulta.

Estas diferenças não se restringem apenas ao comportamento e fisiologia<sup>22</sup>. A maneira como ocorrem, estão baseadas na hipótese do efeito organizacional dos hormônios que ocorrem em períodos críticos do desenvolvimento, períodos em que os tecidos são mais sensíveis a ação dos hormônios. Envolvem alterações na estrutura neural e nos circuitos neuronais e na resposta a estímulos hormonais<sup>22</sup>.



Além do efeito organizacional dos esteróides sexuais, encontramos também seu efeito ativacional. São efeitos transitórios e reversíveis, em geral por atividade neuroquímica.

Estas diferenças levarão a diferentes respostas, incluindo a resposta imune que já está demonstrada como sendo também dimórfica e também relacionada a períodos críticos do desenvolvimento (organizacional). A observação final é que as diferenças sexuais são produto da ação dos esteróides sexuais durante fases iniciais do desenvolvimento, durante puberdade e durante a vida adulta.

Portanto, a exposição à secreção dos testículos em períodos precoces da vida tem efeitos permanentes no SNC, tais efeitos são organizacionais e definitivos, não sendo transitórios ou reversíveis como os efeitos ativacionais que a testosterona produz em ratos adultos.

Até o momento, não encontrou-se um modelo experimental que possibilite o estudo dos efeitos produzidos pela retirada da testosterona antes do quinto dia de vida pós-natal de ratos machos e sua influência na sobrevivência destes animais quando atingem a idade adulta após serem submetidos à uma infecção bacteriana produzida experimentalmente.

## **2. OBJETIVO**

Avaliar os efeitos da castração pós-natal na sobrevivência de ratos submetidos a sepse aguda experimental.

## 3. MÉTODO

### 3.1. AMOSTRA

Em todo o experimento, foram utilizados 40 ratos albinos (n=40) da espécie *rattus norvegicus*, da linhagem Wistar, de ambos os sexos, com idade variando de 4 dias a 4 meses, oriundos do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), acomodados durante o experimento na sala de observação de animais do Laboratório de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental do Departamento de Clínica Cirúrgica da UFSC.

Foram instalados, até o ato cirúrgico em gaiolas de plástico de 16x40x60 centímetros, com água e ração própria para a espécie, *ad libitum*. Permaneceram acomodados à luz natural e em condições ambientais adequadas.

#### SUBGRUPOS DE ANIMAIS

Os 40 animais do Grupo Experimento foram distribuídos da seguinte forma (Quadro 1):

##### SUBGRUPO GM (n=10)

Machos adultos, nos quais foi induzida a peritonite e observada a evolução clínica;

##### SUBGRUPO GF (n=10)

Fêmeas adultas, nas quais foi induzida a peritonite e observada a evolução clínica;

##### SUBGRUPO GMC (n=10)

Machos recém-nascidos castrados, os quais foram submetidos a orquiectomia bilateral aos 4 dias de vida e aguardou-se 60 dias para sua utilização na indução da peritonite e observação da evolução clínica;

## SUBGRUPO GMCR (n=10)

Machos recém-nascidos castrados com reposição de testosterona, os quais foram submetidos a orquiectomia bilateral aos 4 dias de vida, repondo-se a testosterona do 5.º ao 11.º dias de vida e aguardou-se 60 dias para sua utilização na indução da peritonite e observação da evolução clínica.

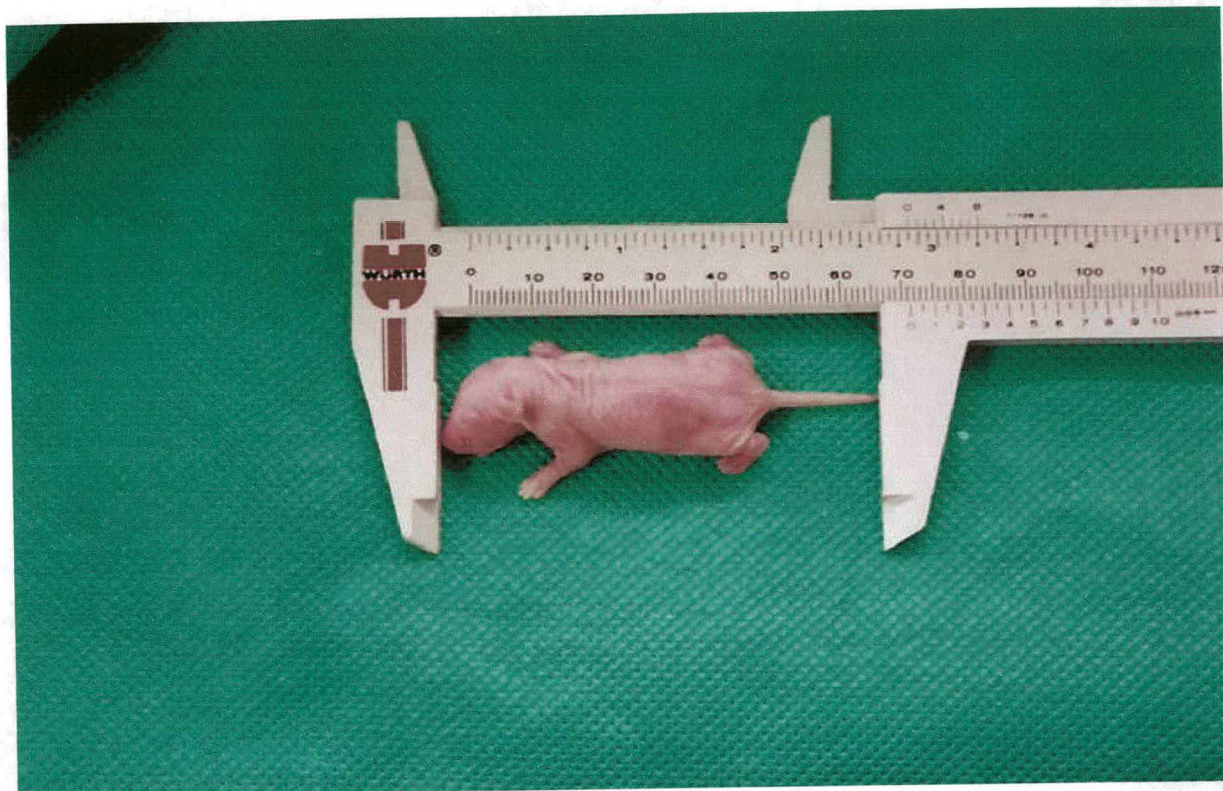
**QUADRO 1** – Grupos de animais distribuídos conforme sexo, castração e castração com reposição de testosterona.

<b>SUBGRUPOS</b>	<b>n</b>
Machos adultos GM	10
Fêmeas adultas GF	10
Machos castrados GMC	10
Machos castrados com reposição GMCR	10
<b>TOTAL</b>	<b>40</b>

## 3.2. PROCEDIMENTOS

### ANESTESIA NOS RECÉM NASCIDOS

O procedimento foi realizado em ratos com até 4 dias de vida pós-natal (Figura 1). Os animais foram submetidos à anestesia geral por inalação de éter etílico. Considerou-se plano anestésico o momento que o animal perdia o reflexo de retirada de membro inferior ao estímulo doloroso.



**Figura 1** – Fotografia de um rato macho de 4 dias de vida pós-natal

### **ANESTESIA NOS ANIMAIS ADULTOS**

Os animais foram submetidos a anestesia geral com indução por inalação de éter etílico com efeito sedativo, neste momento eram pesados e após, mantidos por injeção intramuscular na face interna da pata traseira direita com uma solução de Pentobarbital sódico 3% (Hypnol 3% Fontoveter, Itapira, SP) mais cloridrato de 2-(2,6-xilidino)-5,6 dihidro-4H-1,3-tiazina 2% (Rompun, Bayer, São Paulo, SP.), nas doses de 20 e 10 mg por Kg peso respectivamente. Confirmação do plano anestésico quando a animal perdia o reflexo de retirada do membro inferior ao estímulo doloroso.

### **CASTRAÇÃO**

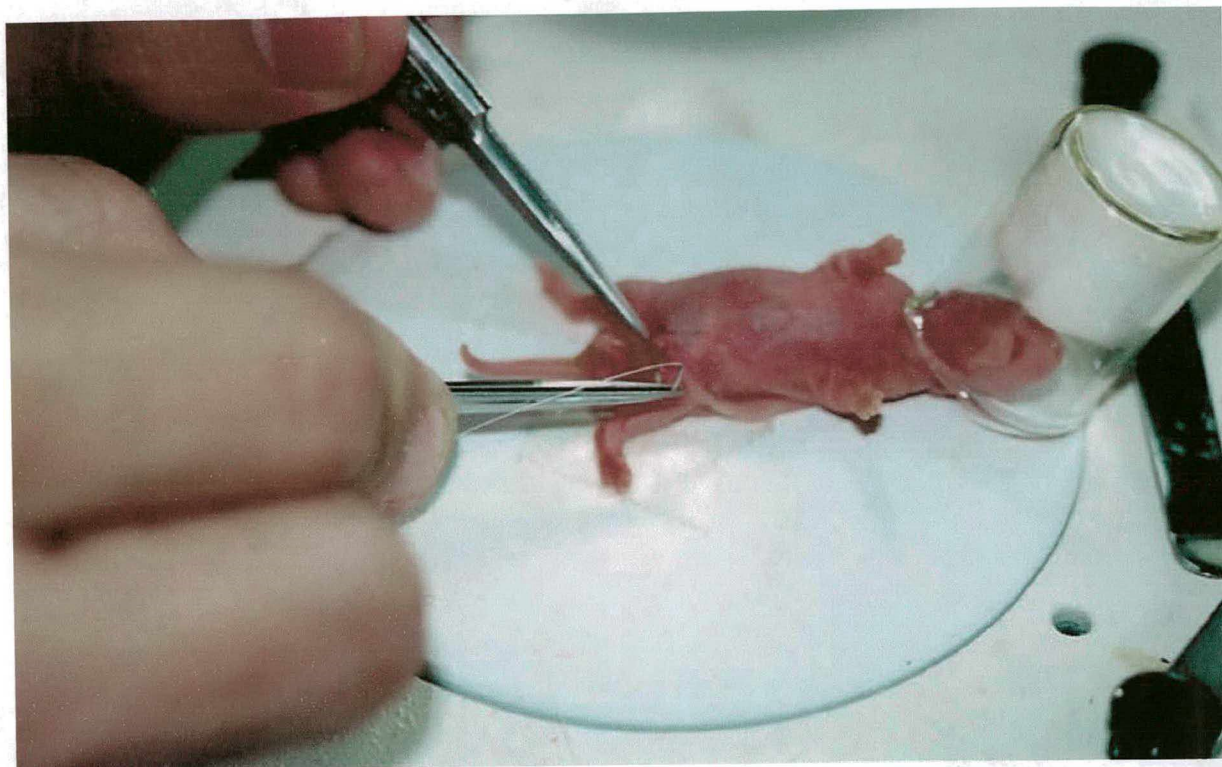
Mantidos imobilizados em decúbito dorsal com fixação por fita adesiva dupla face em lupa cirúrgica (Metrimpex, Hungary®) com aumento de 1 a 1,6 vezes. Antissepsia com iodopovidona 1%. Realizado incisão de aproximadamente 0,3 cm na transição da cicatriz



umbilical e o ânus em cada lado. Abertura da musculatura e do peritônio, identificação do testículo que era tracionado para fora (Figura 2) e ligado com fio de poliglactina 6.0 e seccionado. Sutura da pele com poliglactina 6.0 (Figura 3). Mantidos aquecidos sob lâmpada até a recuperação da anestesia, quando eram devolvidos à caixa com a mãe. Mantidos aí até completar 21 dias de vida quando eram separados da mãe, em grupo de até 5 animais por caixa.



**Figura 2** – Fotografia de um rato macho sendo submetido a castração. No detalhe testículo exposto antes da ressecção.

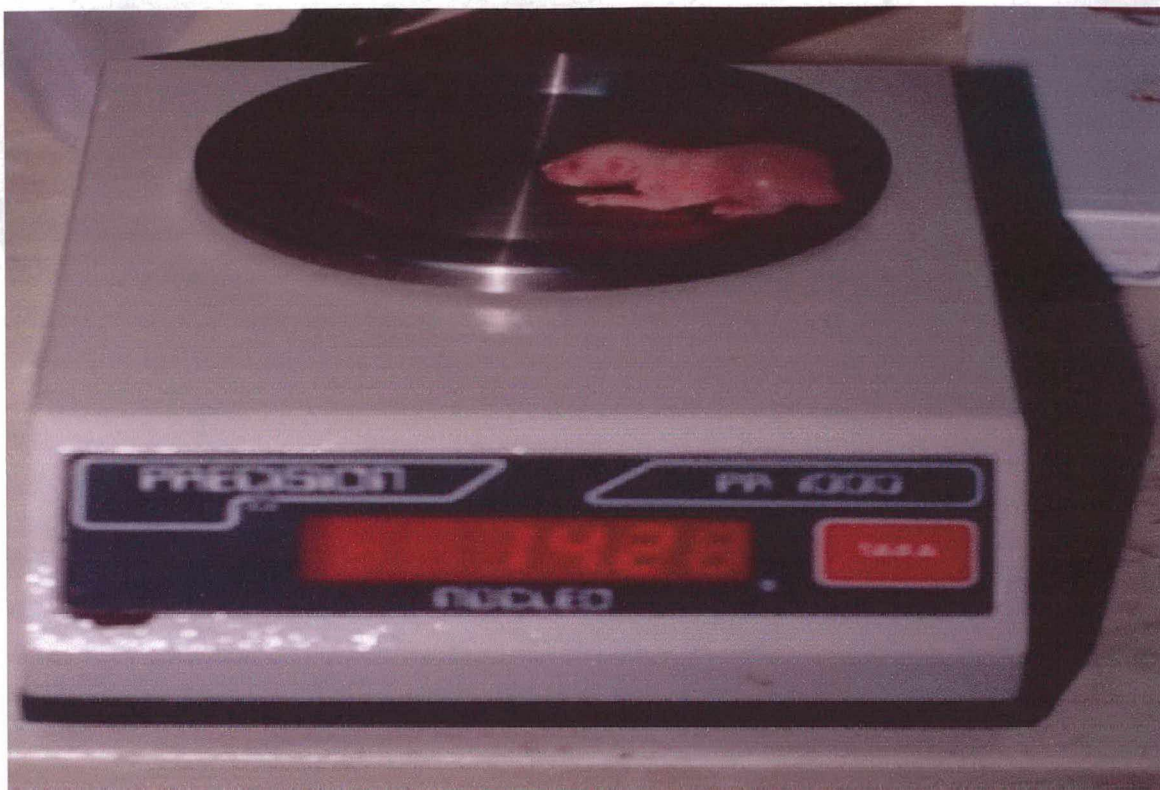


**Figura 3** – Fotografia da sutura de pele após castração de um rato macho.

### **REPOSIÇÃO DE TESTOSTERONA**

Os animais do subgrupo castrado com reposição, após o procedimento acima foram submetidos à reposição de testosterona. Os animais eram pesados diariamente em uma balança de precisão (Zanott, Balanças de Precisão Ltda, Pirituba, SP) (Figura 4). A dose aplicada foi de 0,1 mg por quilograma de peso (Kg), em veículo oleoso, preparado por manipulação<sup>23</sup>. A aplicação foi realizada no tecido celular subcutâneo do dorso com seringa de insulina (Figura 5). Foram feitas durante 7 dias consecutivos no mesmo horário a partir de 24 horas da castração.





**Figura 4** – Fotografia de um rato macho sendo pesado, antes da reposição de testosterona.



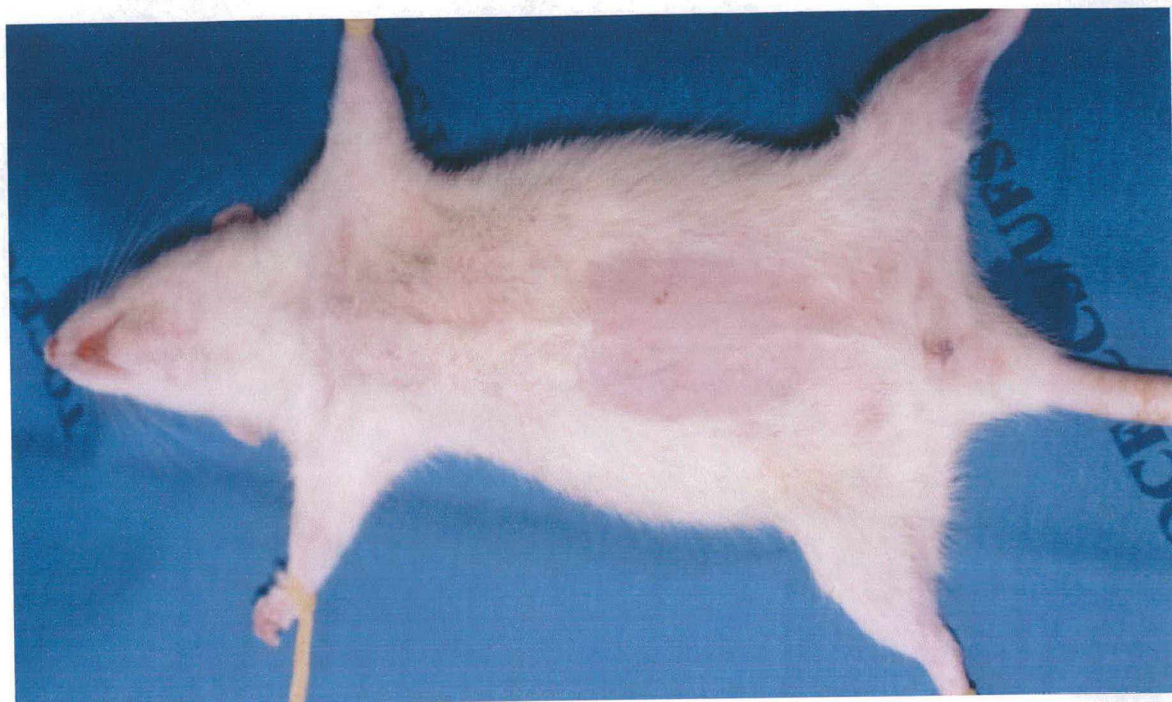
**Figura 5** – Fotografia mostrando a aplicação de testosterona em um rato macho castrado.



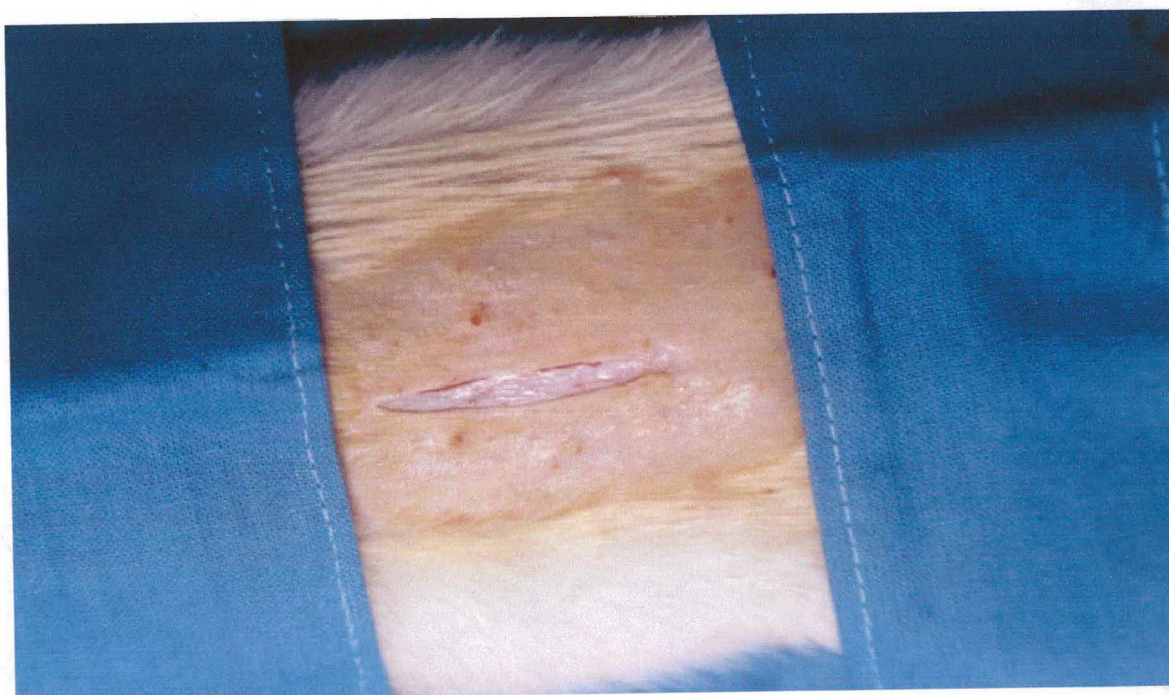
## SEPSE EXPERIMENTAL

Depois de completado 60 dias os subgrupos castrado e castrado com reposição foram submetidos a indução da sepse experimental. Os subgrupos machos e fêmeas foram submetidos à sepse da mesma forma com idade aproximada de 4 meses de vida. Utilizamos o procedimento de ligadura e perfuração cecal (LPC), conforme descrito por Wichterman em 1980)<sup>24</sup>.

Os animais eram fixados à mesa operatória pelas quatro patas, realizada tricotomia com tesoura na parte inferior do abdome com extensão de 3x4 cm (Figura 6). Antissepsia com iodopovidona. Incisão longitudinal no abdome inferior com 3 cm de extensão, com tesoura (Figura 7). Abertura da musculatura e do peritônio seguida da identificação do ceco na cavidade abdominal. Este era tracionado para fora da cavidade e era procedida a ligadura do colo logo acima da entrada do íleo terminal, com fio de seda 3.0 (Figuras 8 e 9). Após era realizado duas perfurações transfixantes logo abaixo da entrada do íleo terminal e outra acima da entrada do terceiro vaso na parte inferior ceco, com instrumento pérfuro-cortante com 5,5 milímetros (mm) de espessura (Figuras 10,11,12). As alças eram devolvidas à cavidade e o abdome era fechado por planos. Peritônio, musculatura com polipropileno 3.0 em sutura contínua e a pele também com sutura contínua com polipropileno 3.0 (Figura 13). Os animais eram colocados em caixas individuais identificadas com número e os dados eram anotados na ficha própria (Anexo 1).

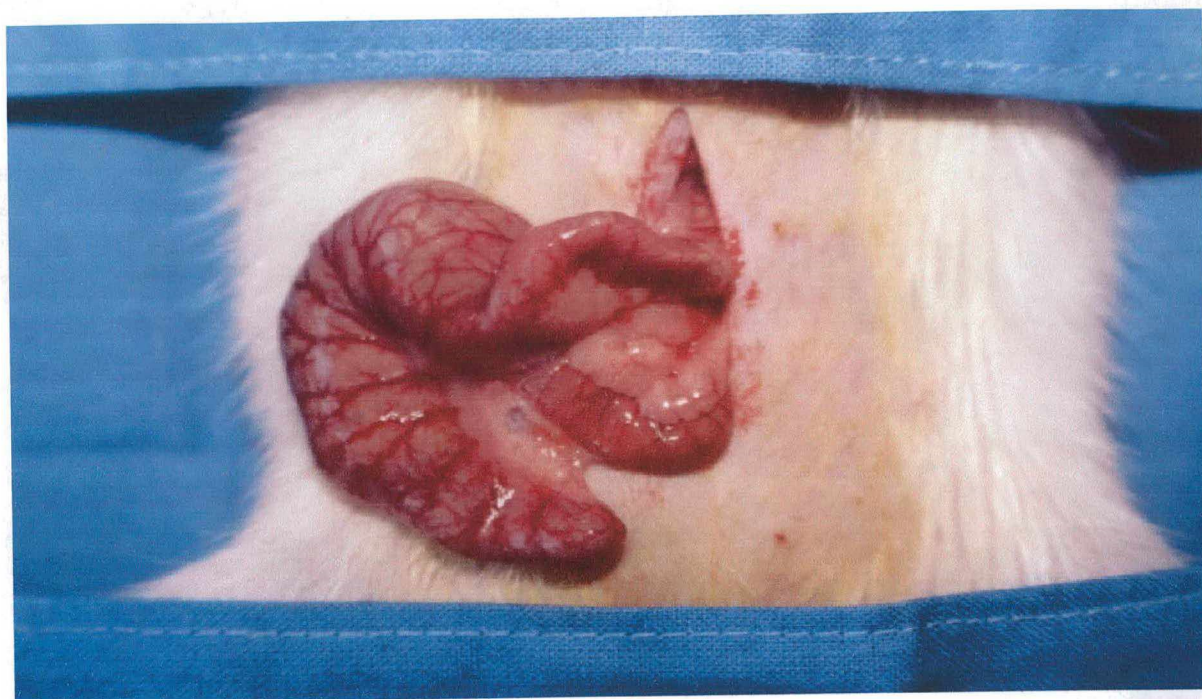


**Figura 6** – Fotografia de um animal adulto anestesiado e fixo à mesa para ser submetido à ligadura e perfuração cecal (LPC).

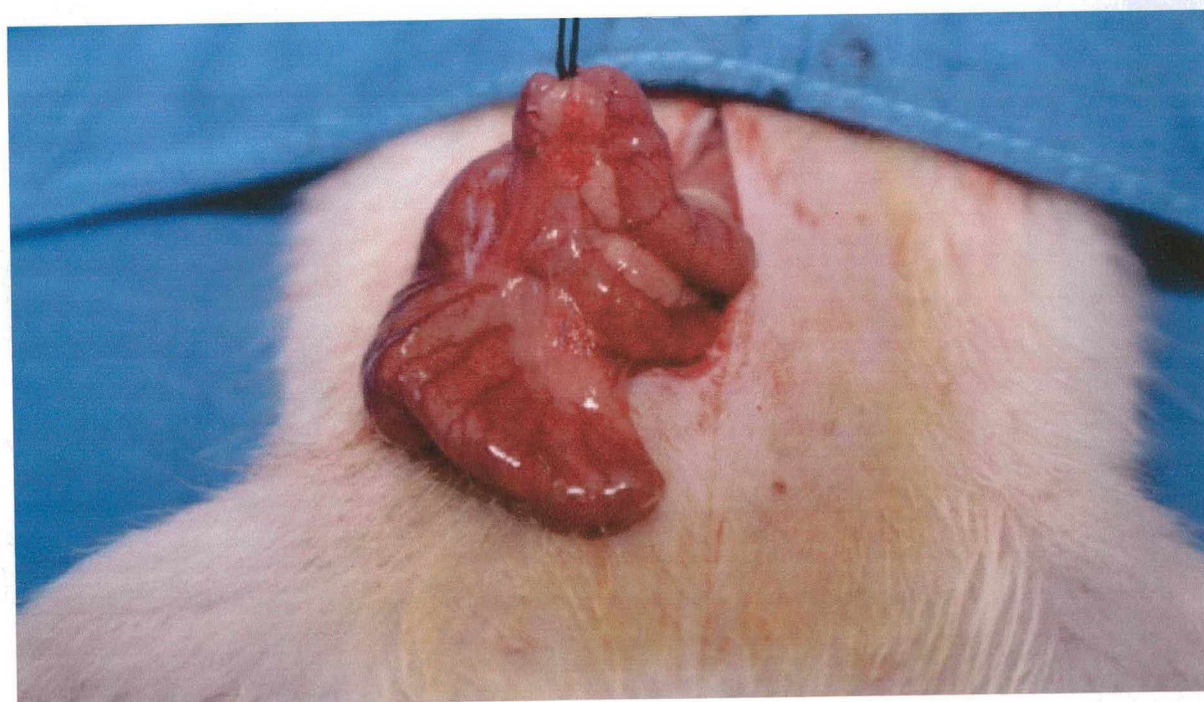


**Figura 7** – Fotografia mostrando a incisão para realização da LPC.



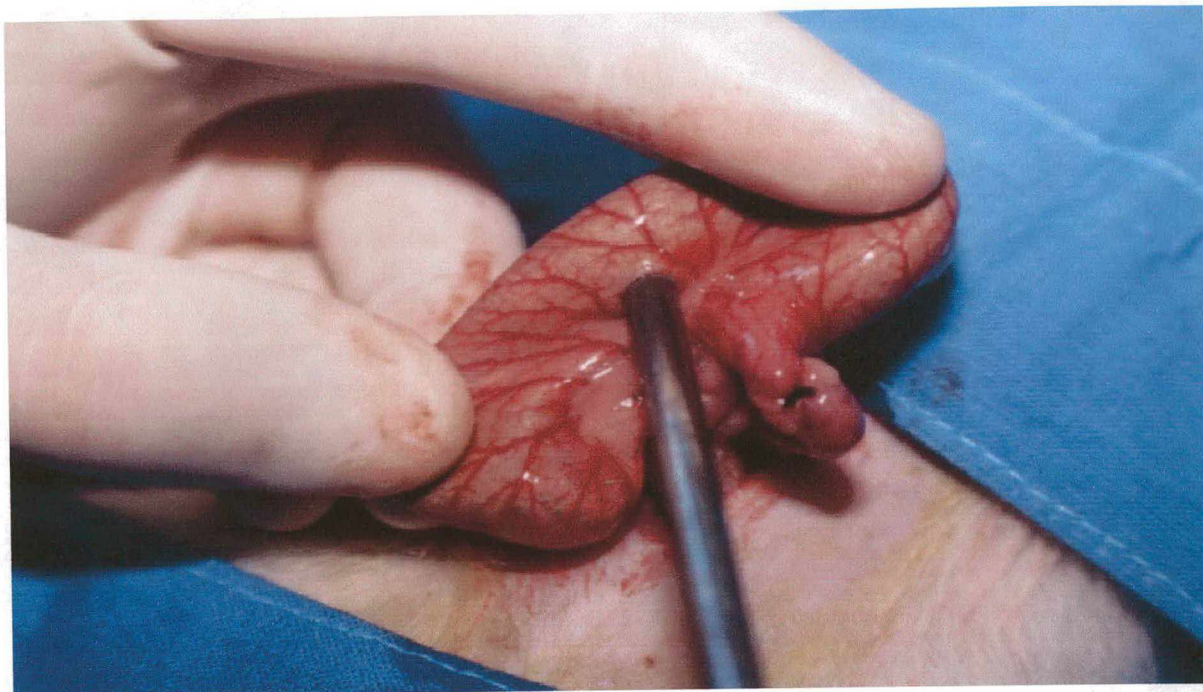


**Figura 8** – Fotografia mostrando detalhe da anatomia do íleo terminal, ceco e colo ascendente.

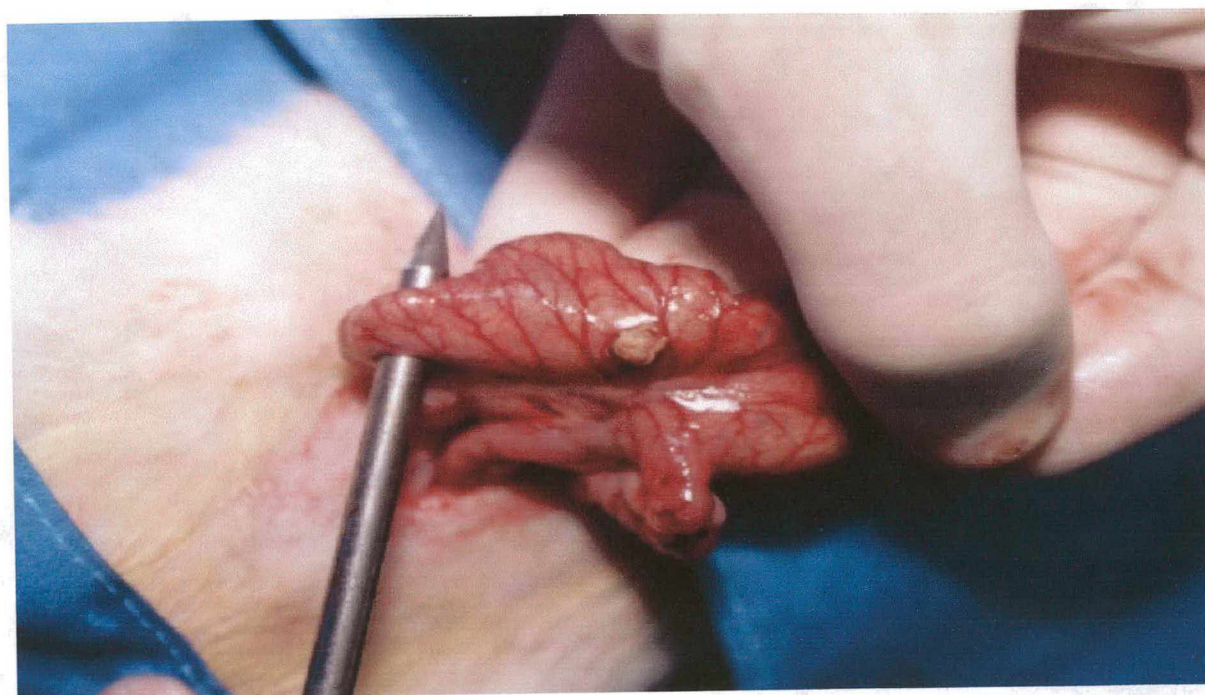


**Figura 9** – Fotografia mostrando a ligadura do ceco, logo acima do íleo terminal com fio inabsorvível.





**Figura 10** – Fotografia mostrando a primeira perfuração transfixante do ceco.



**Figura 11** – Fotografia mostrando a segunda perfuração transfixante do ceco.





**Figura 12** – Fotografia mostrando aspecto final de ligadura e das duas perfurações do ceco.



**Figura 13** – Fotografia mostrando sutura da pele ao final da LPC.

## **AValiação Pós-Operatória**

Os animais foram avaliados de 1 em 1 hora, na procura de sinais que evidenciassem a sepse, como: eriçamento dos pêlos, diminuição da mobilidade, hemorragia conjuntival, anorexia, perda da necessidade de água, até o momento do óbito. O tempo foi medido em horas e minutos. Após 72 horas, as observações de ocorrência do óbito eram feitas a cada 6 horas.

Considerou-se não óbito os animais que permaneceram vivos, mesmo após acompanhamento por mais de 10 dias. Considerou-se o final do experimento o momento do último óbito registrado.

## **AValiação Estatística**

As observações foram estruturadas numa base de dados utilizando-se o programa EXCEL® (*Office 2000*) e para análise estatística, foi empregado o programa STATISTICA 6® (*StatSoft*). Para a confecção da curva de sobrevivência de Kaplan-Meier foi utilizado o programa EPI INFO 6®.

As análises foram feitas em 2 tempos distintos: óbitos até 24 horas e óbitos até o final do experimento.

Foram utilizados os seguintes procedimentos estatísticos:

Análise de variância por postos de Kruskal-Wallis<sup>25</sup> com a finalidade de comparar os quatro grupos com relação às variáveis estudadas: óbito, óbito em 24 horas e não óbito. Foi admitida significância estatística para valores de “p” < ou = 0,05.

Análise de correspondência múltipla (ACM), com a finalidade de avaliar a associação entre os grupos, considerando as variáveis óbito até 24 horas, óbito após 24 horas e não óbito. Trata-se de uma técnica descritiva e exploratória, que possibilita analisar variáveis categóricas, dispostas em tabelas de contingência, de onde podem surgir padrões de associação de variáveis. Os dados são apresentados em uma tabela de frequência chamada Tabela de Burt.



Considerou-se como pressuposto da validade da associação um percentual de inércia maior que 70% <sup>26</sup>.

Utilizou-se a curva de sobrevida de Kaplan-Meier. Esta curva tem como objetivo estimar a probabilidade de sobrevivência de um grupo em um intervalo de tempo definido (probabilidade condicionada). Utiliza uma função de sobrevida não paramétrica. A variável estudada foi o tempo que transcorreu até que a ocorrência do óbito.

Considerou-se o estado inicial no estudo, todos os animais vivos no momento da intervenção (indução da sepse). A falha foi considerada o óbito até 24 horas. Considerou-se censura permanecer vivo após 24 horas.

Utilizou-se o teste *log-rank*, para avaliação da significância das diferenças de sobrevida. Foi admitida significância estatística para valores de "p" < ou = 0,05 <sup>25</sup>.

## 4. RESULTADOS

**TABELA 1:** Efeito da castração pós-natal sobre a mortalidade na sepse em ratos. Ocorrência de óbito nos animais submetidos a sepse aguda abdominal.

Subgrupos	Óbitos	Não óbito	Total	% óbitos
GF	07	03	10	70%
GMC	08	02	10	80%
GMCR	09	01	10	90%
GM	10	00	10	100%
<b>Total</b>	<b>34</b>	<b>06</b>	<b>40</b>	<b>85%</b>

GF: subgrupo fêmeas; GMC: subgrupo machos castrados; GMCR: subgrupo machos castrados com reposição de testosterona; GM: subgrupo machos.

**TABELA 2:** Efeito da castração pós-natal sobre a mortalidade na sepse em ratos. Representação percentual do óbito dos animais submetidos a sepse aguda abdominal que foram a óbito até 24 horas.

Subgrupos	Óbito em até 24 horas	%	Qui-Quadrado
GF	3	11,54%	0,072
GMC	5	19,23%	0,013
GMCR	8	30,77%	0,013
GM	10	38,46%	0,072
<b>Total</b>	<b>26</b>	<b>100%</b>	<b>0,171598</b>

GF: subgrupo fêmeas; GMC: subgrupo machos castrados; GMCR: subgrupo machos castrados com reposição de testosterona; GM: subgrupo machos.

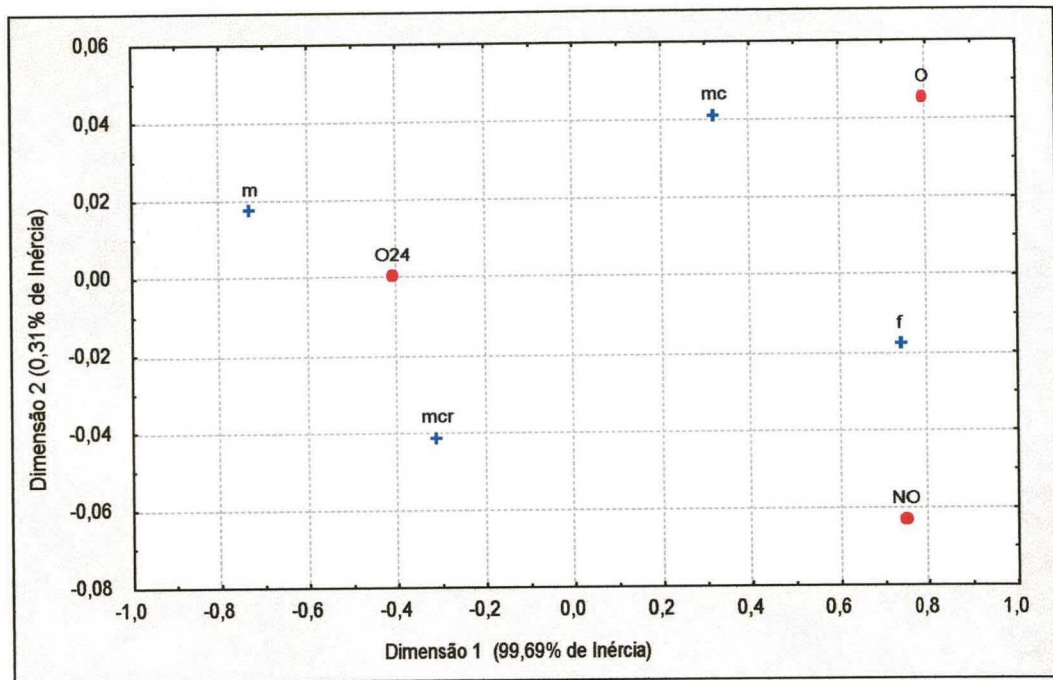
\*  $p = 0.0180$



**TABELA 3:** Efeito da castração pós-natal sobre a mortalidade na sepse em ratos. Ocorrência do óbito e não óbito em ratos submetidos a sepse aguda abdominal até 24 horas e após 24 horas

<b>Subgrupos</b>	<b>Óbito Até 24 horas</b>	<b>Óbitos após 24 horas</b>	<b>Total de óbitos</b>	<b>Não óbito</b>
GF	3	4	7	3
%	30%	40%	70%	30%
GMC	5	3	8	2
%	50%	30%	80%	20%
GMCR	8	1	9	1
%	80%	10%	90%	10%
GM	10	0	10	0
%	100%	0%	100%	0%
<b>Total</b>	<b>26</b>	<b>8</b>	<b>34</b>	<b>6</b>
<b>%</b>	<b>65%</b>	<b>20%</b>	<b>85%</b>	<b>15%</b>

GF: subgrupo fêmeas; GMC: subgrupo machos castrados; GMCR: subgrupo machos castrados com reposição de testosterona; GM: subgrupo machos.



**Figura 14** – Análise de correspondência múltipla para as variáveis óbito, óbito até 24 horas e não óbito, de ratos submetidos a sepse abdominal.

**LEGENDA:**

- f** – subgrupo fêmea
- mc** – subgrupo macho castrado
- m** – subgrupo macho
- mcr** – subgrupo macho castrado com reposição
- O** – óbito após 24 horas
- O24** – óbito até 24 horas
- NO** – não óbito

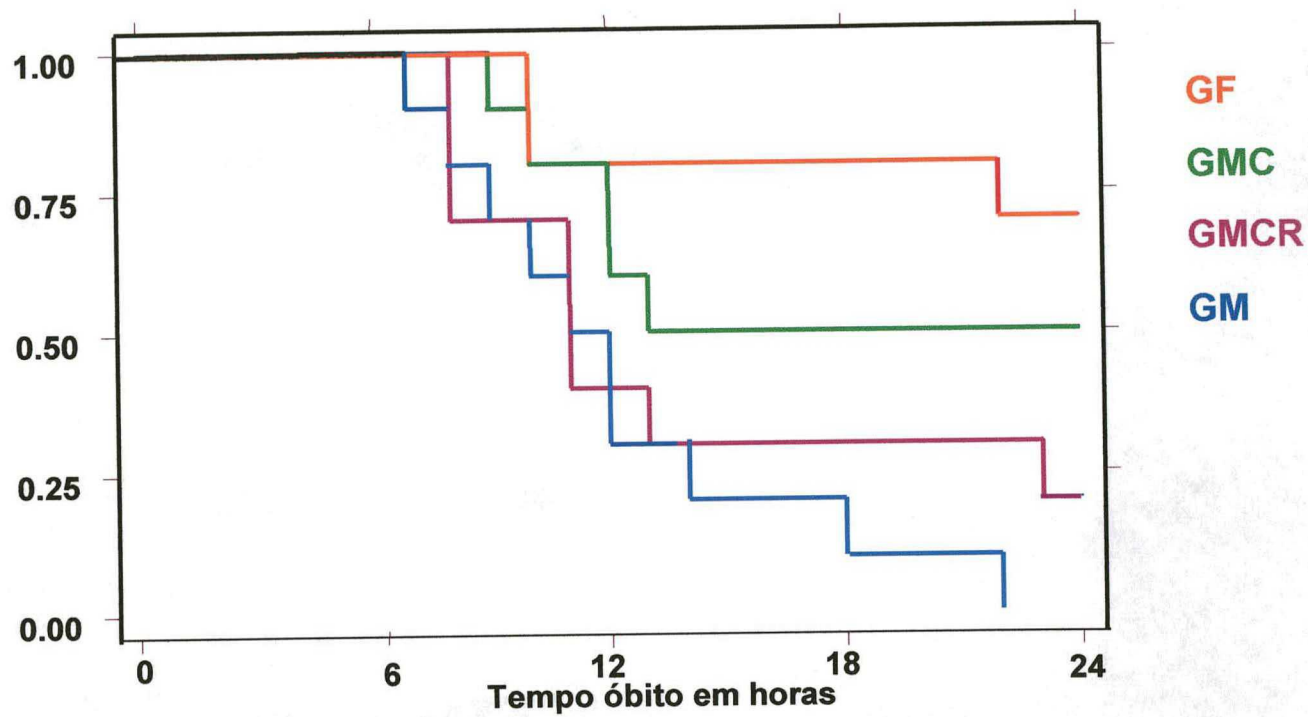


Figura 15 – Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier para órbita em 24 horas.

\* $p = 0,0055$  entre quatro grupos.

\* $p = 0,0005$  entre GM e GF

## 5. DISCUSSÃO

A sepse continua sendo um grande desafio para clínicos e cirurgiões.

Nos Estados Unidos, a cada ano, estima-se 400.000 casos de sepse, onde metade deles evoluem para choque séptico, com aproximadamente 100.000 mortes<sup>27</sup>.

É consenso que apesar dos enormes esforços de pesquisadores na compreensão da fisiopatologia da sepse, do descobrimento de um grande número de novos antimicrobianos, da existência de tratamentos multivariados que atuam na resposta inflamatória, além do grande progresso na terapia de suporte de vida, pouco se conseguiu na prevenção e na diminuição da mortalidade da sepse nas últimas décadas<sup>28</sup>.

À luz destes fatos, há a necessidade de continuar, de forma intensa, a procura de novas alternativas de estudo da fisiopatologia e de opções terapêuticas para esta entidade. Assim sendo, os trabalhos experimentais, utilizando diversas espécies animais continuam como a melhor opção de estudo, criando novos modelos de pesquisa para posterior aplicação em ensaios pré-clínicos<sup>29</sup>.

Uma imensa variedade de modelos já foi minuciosamente descrita, porém os modelos de peritonite têm sido considerados como os mais adequados pelos investigadores, para o estudo da fisiopatologia desta doença, cuja complexidade ainda não se conseguiu alcançar.

Para estudo da sepse e do choque séptico, a escolha da espécie animal é ditada por fatores como disponibilidade, custo, aprovação pelas comissões de ética e estudo em animais, assim como a quantidade e qualidade dos parâmetros que se pretende avaliar. Por ser de baixo custo de aquisição e manutenção, os pequenos roedores como camundongos, ratos e cobaias são os mais adequados para muitos estudos, particularmente quando uma grande quantidade de animais é necessária para a pesquisa<sup>3,30</sup>.

Um dos modelos de peritonite largamente utilizado na pesquisa experimental para estudo da sepse, foi idealizado por Wichterman (1980)<sup>24</sup>, onde o ceco é obstruído mecanicamente com um fio inabsorvível distal à válvula íleo-cecal, sendo perfurado com instrumento pérfuro-contuso.

Este modelo é conhecido como ligadura e perfuração cecal (LPC), onde a grande vantagem, é a simplicidade de execução e a facilidade de reprodução. Além disso, é um modelo realizado com contaminação peritoneal cuja flora é mista, similar aos problemas infecciosos abdominais nos humanos, como apendicite e diverticulite.

Este modelo ocasiona uma peritonite e conseqüente sepse polimicrobiana e é capaz de mostrar hemoculturas positivas após a LPC, com mortalidade reprodutível de mais de 50% após 48 horas, dependendo do número e do tamanho das perfurações<sup>31, 32</sup>.

Optou-se pelo modelo de LPC com uma pequena variação no método de perfuração, pois Wichterman, utilizava ratos Holtzman, previa as perfurações com agulha 18 e 22-gauge, e no modelo estudado foram utilizados ratos Wistar com perfuração por transfixação do ceco em 2 locais distintos, com um instrumento perfuro-contuso de 5,5 mm de diâmetro. No estudo piloto, obteve-se 65 % de óbito em até 24 horas.

Em decorrência da revisão da literatura sobre o assunto, observou-se o aspecto multifacetado das variáveis na sepse, encontrando-se estudos clínicos e epidemiológicos que demonstravam uma diferença de resposta à doença, principalmente quanto ao índice de mortalidade, quando se analisava a ocorrência da infecção do sexo masculino em relação ao feminino.

Em nosso meio d'Acampora (1996)<sup>3</sup>, em estudos experimentais da sepse em ratos, já havia percebido um maior número de óbito entre os machos e mais rápido quando comparado com as fêmeas, que aparentemente resistiam melhor à peritonite e a sepse conseqüente.

Offner (1999)<sup>33</sup>, estudando pacientes vítima de trauma, demonstrou que os homens apresentam um maior risco de infecção após o evento traumático, estudando 545 pacientes adultos.

Nesta mesma linha, Oberholzer (2000)<sup>34</sup> ao avaliar 1276 pacientes politraumatizados, encontrou diferença significativa na incidência de sepse pós-trauma, bem como a ocorrência da síndrome da disfunção orgânica múltipla. Ao analisar o sexo dos pacientes, percebeu uma predominância de pacientes do sexo masculino.

Schroder (1998)<sup>10</sup> em estudo prospectivo com 52 pacientes em UTI encontrou uma mortalidade de 70% entre homens contra 26% em mulheres, em grupos homogêneos quanto à idade, origem e severidade da sepse.

Um outro estudo, de Yesilova (2000) <sup>35</sup>, avaliando pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico idiopático, e comparando parâmetros de imunidade antes e após a reposição com gonadotrofina, concluiu que a ausência de testosterona resulta num aumento da imunidade celular e humoral.

Estes fatos revelados pela literatura utilizada, levaram ao estudo em curso pois não foi encontrado trabalho que mostre o desenho de pesquisa experimental utilizado neste trabalho, onde se estudou grupos de ratos machos adultos, fêmeas adultas, machos castrados no 4.º dia de vida e machos castrados no 4.º dia de vida com reposição hormonal do 5º ao 11º dia de vida.

Neste estudo esperou-se que os ratos recém-nascidos e castrados alcançassem a idade adulta e então foi provocada a peritonite por LPC, no mesmo dia em todos os grupos e pelo mesmo pesquisador, observando-se os animais clinicamente até a ocorrência de óbito.

A expectativa era a ocorrência de óbito em ordem decrescente nos subgrupos machos (GM), machos castrados com reposição (GMCR), machos castrados (GMC) e fêmeas (GF), pois Yesilova (2000) <sup>35</sup> afirma que a ausência de testosterona resulta em aumento da imunidade celular e humoral.

Após o experimento realizou-se a avaliação dos óbitos ocorridos.

A mortalidade global verificada no experimento foi de 85% dos animais. Considerou-se esta taxa satisfatória, visto que pretendeu-se estudar a sepse aguda. As taxas de óbitos por subgrupos foram progressivas entre os GF, GMC, GMCR e GM, com 70, 80, 90 e 100% respectivamente. A análise estatística não mostrou diferença significativa neste período, apesar desta tendência dos dados. Quando comparados isoladamente os subgrupos GF e GM obtivemos  $p=0.0637$ . Isso pode sugerir que se a amostra do experimento fosse maior, talvez houvesse uma relação de significância dos resultados obtidos (Tabelas 1 e 3).

Quando avaliados apenas os óbitos que ocorreram até 24 horas, revelou-se o número de 26 animais, o equivalente a 65% do total de animais do experimento ou a 76% de todos os animais que chegaram ao óbito (Tabela 2).

Na avaliação comparativa entre os subgrupos, houve uma progressão nas taxas de óbito entre eles, sendo o GF 11,54%, GMC 19,23%, GMCR 30,77% e GM de 38,46%. A análise estatística demonstra significância pelo teste de Kruskal-Wallis, com  $p=0,0180$ . Estas

diferenças entre os grupos, associada à aproximação entre o GF e GMC, onde não havia ação da testosterona, sugerem a ação deste hormônio na inibição da resposta imune destes animais (Tabela 2).

Da mesma forma os GM e GMCR, animais que tiveram ação de testosterona ora permanente no GM ora temporário no GMCR, podem indicar que a ação da testosterona inibe a resposta imune à sepse aguda experimental. Esta ação seria em períodos iniciais da vida uma vez que os animais com manipulação hormonal nestes períodos críticos tiveram respostas diferentes na vida adulta.

Analisando-se o estado hormonal destes animais temos a seguinte situação:

GF: fêmeas adultas sem manipulação hormonal. A diferenciação sexual foi mantida naturalmente com ação de estrogênios desde fases iniciais do desenvolvimento.

GMC: ratos machos que na vida intrauterina sofreram ação da testosterona, estendendo-se até o quarto dia de vida pós-natal quando a ação deste hormônio, de origem testicular foi interrompida no período crítico de desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) até o momento da indução da sepse abdominal aguda.

GMCR: ratos machos que na vida intrauterina sofreram ação da testosterona, estendendo-se até o quarto dia de vida pós-natal, submetidos a supressão deste hormônio por 24 horas, sendo repostos de forma exógena até o 11º dia de vida, ainda em seu período crítico de diferenciação sexual. A partir deste momento não sofreu mais ação da testosterona testicular ou exógena.

GM: ratos machos sem manipulação hormonal com diferenciação sexual natural, com ação de testosterona testicular em fases precoces de diferenciação bem como com níveis séricos fisiológicos deste hormônio no momento da sepse aguda experimental.

Com estes valores percentuais observados, neste experimento, podemos inferir que realmente há uma maior resistência das fêmeas à sepse como foi observado. No entanto os machos castrados responderam de forma semelhante às fêmeas, o que pode sugerir que a testosterona deva ter um papel decisivo na resposta imune destes animais. As observações decorrentes do experimento podem ser explicadas pela resposta imune diferenciada entre machos e fêmeas e a literatura é rica em referências quanto ao fato.

O dimorfismo sexual também existe na resposta imune. Ambas respostas humoral e celular são mais ativas nas fêmeas que nos machos. Em humanos, fêmeas são mais afetadas por doenças autoimunes <sup>36</sup>. De um modo geral as fêmeas apresentam uma melhor resposta imune celular e humoral que os machos, e as fêmeas tem maior concentração de imunoglobulinas <sup>37</sup>, e tem maior e mais sustentada produção de anticorpos após imunização e infecção que machos <sup>38, 39</sup>. Níveis de imunoglobulinas variam entre os sexos, com alguns anticorpos como IgG e IgM maior em fêmeas que em machos em resposta a estímulo antigênico. Níveis de linfócitos CD4 também são maiores em mulheres <sup>40</sup>. As fêmeas também têm maior rejeição de aloenxertos, demonstrando uma melhor resposta imune mediada por células <sup>41</sup>. No efeito do sexo sobre o sistema imune (SI), a regulação das células T e B são as mais importantes. A alteração nos níveis de citocinas é proporcional aos níveis de esteróides sexuais e são produtos de células imunes, particularmente população de células T <sup>42</sup>.

Os hormônios sexuais desempenham papel central neste dimorfismo sexual no sistema imune. Os mecanismos envolvidos são complexos e ainda não completamente conhecidos. Poderia ser por ação direta em células imunocompetentes como por exemplo a presença de receptores de androgênios em células do timo <sup>43</sup>. Outro mecanismo poderia ser indireto, mediado pela interação com outros fatores imunomodulatórios como hormônios do timo, hormônio do crescimento e prolactina. Um terceiro mecanismo proposto seria através da influência dos esteróides sexuais nos níveis de glicocorticóides. Dado que os esteróides sexuais afetam o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) diretamente, mas também influenciam células imunocompetentes e produção de citocinas, o efeito total dos esteróides sexuais na resposta dos glicocorticóides ao *stress* pode derivar de todas estas ações <sup>44</sup>.

Os estudos demonstram haver uma inter-relação entre o Sistema Nervoso Central, Sistema Imune e Eixo Hipotálamo-Hipófise- Adrenal. Na década de 70 <sup>14</sup> e posteriormente de 80, Besedovsky <sup>45</sup> demonstrou que hormônios clássicos e as citocinas recém-descobertas estavam envolvidas funcionalmente na comunicação entre o SNC e SI, referindo que as interações entre o SI e neuroendócrino desempenham um papel importante na modulação do eixo HPA em organismos expostos a um estímulo imune.

Este eixo é suscetível a modificações permanentes quando manipulado em fases precoces do desenvolvimento. Shanks (1995) <sup>46</sup> demonstrou que a exposição a endotoxinas em períodos críticos do desenvolvimento diminui o *feedback* negativo do glicocorticóide



sobre o ACTH, aumentando a resposta do eixo HPA ao stress. As respostas sexo específicas nos animais adultos podem ser manipuladas pela administração de hormônios no período neonatal, conforme descrito por Hiemke (1992)<sup>47</sup>. Assim, Del Rey (1996)<sup>48</sup> demonstrou que a administração de IL-1 até o quinto dia de vida em camundongos causava alterações permanentes no eixo HPA, com redução dos valores basais de corticosterona e aumento na relação ACTH/corticosterona. Konstandoulakis (1995)<sup>6</sup> concluiu que a manipulação com esteróides sexuais no pré e pós-natal pode provocar efeitos duradouros na resposta imune, e também alterar diferenças existentes na resposta imune entre machos e fêmeas.

A castração na vida adulta também foi estudada e demonstrou diferenças na resposta imune. Rife (1990)<sup>49</sup> demonstrou que camundongos castrados na vida adulta apresentam uma melhor resposta a estímulo antigênico, efeito reduzido pela administração de testosterona. Wilson (1995)<sup>50</sup> observou que a castração de camundongos machos adultos tem um aumento importante na produção de linfócitos B. A castração de ratos adultos faz com que haja aumento dos níveis plasmáticos de ACTH e corticosterona em resposta o *stress*, efeito este revertido pela reposição de testosterona<sup>51</sup>. Wichmann (1997)<sup>52</sup> estudando a resposta imune de ratos normais e castrados no trauma de partes moles e choque hemorrágico, concluiu que os esteróides sexuais masculinos tem efeito imunossupressor. Sugere também que os bloqueadores de androgênios teriam potencial para uso clínico. Outros efeitos da castração na vida adulta são o aumento do compartimento de células B periféricas, aumento da capacidade de produção de imunoglobulinas autorreativas<sup>53</sup> aumento da capacidade de fagocitose pelos macrófagos<sup>54</sup>.

Da Silva (1999)<sup>55</sup>, em humanos demonstrou que níveis de estradiol aumentavam e testosterona inibia a resposta endógena de glicocorticóide após estímulo inflamatório, com padrão similar ao de experimentos em animais.

No presente experimento foi realizado uma modulação experimental do eixo HPA da resposta imune ao castrar-se os no 4.º dia de vida extra-uterina os ratos machos. Desta forma, foi impedido que este eixo fosse completado como nos ratos machos normais. Nos ratos machos normais, a presença da testosterona, durante esta primeira semana de vida pós-natal, modifica a organização dos circuitos cerebrais que vão modular a resposta imune destes animais quando atingirem a idade adulta.

Atualmente está estabelecido que o sistema imune e o eixo HPA são mutuamente regulatórios e que sua interação pode ser um fator determinante quando se analisa os efeitos do *stress* sobre a resposta imune. Portanto, um processo inflamatório experimentalmente provocado deve influenciar o eixo HPA e como consequência modificar a resposta imune .

Atenção especial está sendo dada ao papel de períodos precoces da vida e o eixo HPA determinando predisposição e susceptibilidade a doenças em longo prazo <sup>56</sup>. Como os esteróides sexuais, aparentemente, são os responsáveis pela regulação desta resposta, é sugestivo que a interrupção desta modulação em períodos críticos do desenvolvimento permita uma resposta, nos machos castrados, semelhante às fêmeas.

Já está estabelecido pela literatura <sup>57</sup> que assim como outras formas de desenvolvimento da plasticidade, a diferenciação sexual da rede neural para o comportamento reprodutivo é caracterizado por períodos críticos durante os quais, interações específicas entre as células em desenvolvimento e seu ambiente determinam futuras capacidades de comportamento.

Períodos críticos do desenvolvimento, são parte da seqüência natural de crescimento, a cada estágio do desenvolvimento uma escolha é feita dentro de um número limitado de alterações. Uma vez feita esta escolha neste período, é praticamente impossível reverter o resultado.

O sexo cromossômico do indivíduo é estabelecido na concepção quando o esperma do macho contribui com um cromossomo X ou Y. O sexo genético determina se a gônada embriônica bipotencial diferenciará como ovário ou testículo. Os passos subseqüentes na diferenciação resultam da ação de hormônios. Se o cromossomo Y está presente, os testículos desenvolvem e sua secreção hormonal resulta no desenvolvimento de um fenótipo masculino. O mesmo não é verdadeiro para o desenvolvimento do ovário e diferenciação das fêmeas. A remoção do tecido gonadal de fetos de coelhos, desenvolve todos os animais com fenótipo feminino, independente se geneticamente são XX ou XY. Portanto, o fenótipo feminino pode desenvolver na ausência de qualquer tecido gonadal. A testosterona secretada pelos testículos masculiniza os órgãos sexuais, glândula mamária rudimentar e o SNC.

No adulto, os esteróides sexuais primariamente ativam a resposta sexual . Então, a ação dos hormônios gonadais sobre o sistema nervoso maduro é ativacional e transitória.

Em nosso experimento, este tipo de efeito causado pelos hormônios sexuais (efeito ativacional) não pode ser analisado, já que, empregamos a castração de ratos machos recém-nascidos, nos quais os circuitos cerebrais do eixo HPA que participam do processo modulatório do sistema imune, ainda não foram completamente estabelecidos neste período do desenvolvimento (4º dia de vida pós-natal) <sup>12</sup>.

Portanto, neste experimento estamos analisando o efeito organizacional que a testosterona pode causar durante um dos períodos críticos de desenvolvimento do SNC de ratos, e suas conseqüências para a resposta deste organismo a um desafio séptico.

Nesta pesquisa, também aplicamos a Análise de Correspondência Múltipla (ACM) com a finalidade de pesquisar a ocorrência de associação entre as variáveis dos subgrupos de estudo, óbito após 24 horas, óbito até 24 horas e não óbito.

Os resultados obtidos, demonstrados na Figura 14, sugerem uma associação entre os subgrupos GM e GMCR com o óbito em 24 horas. Por outro lado o GF indica uma forte associação com a ocorrência de óbito após 24 horas e com a ausência de óbito. O GMC teve uma forte associação com o óbito após 24 horas. Tais resultados estão perfeitamente condizentes com os dados observados na literatura, que indicam uma melhor resposta ao desafio séptico das fêmeas em relação ao machos normais.

Os subgrupos GM e GMCR apresentam uma relação de proximidade entre si, da mesma forma que os subgrupos GF e GMC. Os subgrupos que apresentam uma maior diferença de comportamento entre si, são os subgrupos GF e GM.

Considerando-se que os GM e GMCR são os subgrupos em que a presença da testosterona se fazia, quer de forma permanente (GM), quer de forma temporária em período crítico do desenvolvimento (GMCR), estes dados indicam uma relação entre os subgrupos de animais com a presença de testosterona e o óbito, especialmente até 24 horas. Ocorreu também a associação entre si dos subgrupos GF e GMC, ou seja, subgrupos sem a presença de testosterona ou sua presença antes do final do período crítico de ação da testosterona na diferenciação sexual do SNC e do sistema imune. Estes resultados estão condizentes com os dados existentes na literatura, sobre a influência que a testosterona possui sobre a estruturação dos diversos circuitos cerebrais envolvidos na modulação da resposta imune, diante de um desafio séptico.

Não foram encontradas referências na literatura pesquisada, que utilizassem a ACM para avaliar as variáveis acima descritas, impossibilitando, assim, a comparação dos dados obtidos com outros estudos de igual desenho.

É importante observar que no subgrupo GMCR obteve-se a ação da testosterona própria do animal, apenas durante a vida pré-natal e 4 dias de vida pós-natal. Foram castrados e repostos apenas até o 11º dia de vida com propionato de testosterona. A partir daí, não havia mais ação de testosterona testicular. Apesar disso este grupo de animais, apresentou um comportamento muito mais próximo do subgrupo GM do que dos demais grupos. Isso reforça a importância da testosterona em períodos críticos, programando a resposta imune, independente dos níveis séricos de testosterona no momento da sepse aguda induzida.

A sobrevida dos animais também foi analisada pela curva de Kaplan-Meier (Figura 15). Esta curva determina a chance estatística de determinado elemento do grupo estar vivo após um tempo determinado. Assim, no experimento, a chance de uma fêmea estar viva após 24 horas foi de 80% enquanto nos demais subgrupos GMC 50%, GMCR 20% e 0% para o GM. Esta outra forma de verificação da sobrevida, reforça os dados já verificados anteriormente pelos testes de Kruskal-Wallis e pela ACM.

A curva de sobrevida de Kaplan-Meier analisada em 24 horas, mostrou diferença estatística significativa, quando verificada pelo *log-rank*, nos quatro subgrupos ( $p=0,0055$ ). A análise comparativa apenas para os subgrupos GF e GM representa ainda uma maior diferença com  $p = 0,0005$ .

O que explicaria esta maior diferença entre os grupos sem manipulação hormonal (GF e GM), seria a soma das ações dos esteróides sexuais. A primeira, ligada ao período de diferenciação sexual, momento que já estaria havendo a programação para uma resposta diferente entre macho e fêmea. A segunda, ligada aos diferentes níveis circulantes destes esteróides no momento da sepse. Neste caso os estrogênios em maior nível nas fêmeas melhorando a resposta imune a sepse, enquanto que a testosterona no macho exercendo efeito contrário. Não encontramos na literatura pesquisada, trabalhos que utilizassem a metodologia da curva de sobrevida para comparar estes eventos.

A utilização deste desenho de pesquisa mostrou ser útil para futuros estudos do dimorfismo sexual na resposta imune, em particular na avaliação da sepse aguda com óbito precoce. Aspectos da fisiopatologia, relacionados a dosagem de esteróides sexuais,

corticóides, citocinas, contagem de linfócitos deverão ser empregadas para explicar as razões deste dimorfismo. Da mesma forma, experimentos com a utilização de imunomoduladores, em particular esteróides sexuais, seus análogos ou bloqueadores destes esteróides poderão trazer informações úteis no estudo do tratamento da sepse. Traz também à luz a discussão se deveria haver uma atuação mais precoce em termos de imunomodulação com esteróides sexuais em fase iniciais da sepse. Estudos imunohistoquímicos, em particular do SNC, poderão determinar áreas envolvidas no dimorfismo sexual da reposta imune.

Com base nos resultados podemos sugerir que a presença ou ausência de hormônios sexuais nos ratos machos durante a diferenciação sexual do SNC e do SI induzem a resposta imunes diferenciadas na vida adulta quando submetidos à sepse.

## **6. CONCLUSÃO**

1. Aparentemente houve diferença significativa na sobrevida entre os subgrupos submetidos a sepse experimental, quando analisados em 24 horas.
2. Os achados do estudo não mostraram diferença significativa entre os subgrupos na sobrevida, quando analisado até o final do experimento.

## REFERÊNCIAS

1. Parrillo JE, Parker MM, Natanson C, Suffredini AF, Danner RL, Cunnion RE, et al. Septic shock in humans. Advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy. *Ann Intern Med* 1990;113(3):227-42.
2. Brun-Buisson C, Doyon F, Carlet J, Dellamonica P, Gouin F, Lepoutre A, et al. Incidence, risk factors, and outcome of severe sepsis and septic shock in adults. A multicenter prospective study in intensive care units. French ICU Group for Severe Sepsis. *Jama* 1995;274(12):968-74.
3. d'Acampora AJ. Modelo de sepsis experimental em ratos. Estudo clínico e histológico [Doutorado]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina; 1996.
4. Matte ELA, Tholl CJ, d'Acampora AJ. Avaliação da peritonite bacteriana difusa induzida em ratos Wistar. In: UFSC, editor. *IV Seminário Catarinense de Iniciação Científica*; 1994; Florianópolis; 1994. p. 424.
5. Parker SJ, Watkins PE. Experimental models of gram-negative sepsis. *Br J Surg* 2001;88(1):22-30.
6. Konstadoulakis MM, Syrigos KN, Baxevanis CN, Syrigou EI, Papamichail M, Peveretos P, et al. Effect of testosterone administration, pre- and postnatally, on the immune system of rats. *Horm Metab Res* 1995;27(6):275-8.
7. Verthelyi D. Sex hormones as immunomodulators in health and disease. *Int Immunopharmacol* 2001;1(6):983-93.
8. Angele MK, Schwacha MG, Ayala A, Chaudry IH. Effect of gender and sex hormones on immune responses following shock. *Shock* 2000;14(2):81-90.
9. Serafim JDM. Efeito castração pós-natal na sepsis experimental em ratos [TCC]. Florianópolis: UFSC; 2002.
10. Schroder J, Kahlke V, Staubach KH, Zabel P, Stuber F. Gender differences in human sepsis. *Arch Surg* 1998;133(11):1200-5.
11. Stumpf WE. Estrogen-neurons and estrogen-neuron systems in the periventricular brain. *Am J Anat* 1970;129(2):207-17.
12. Goy RW, McEwen BS. Sexual differentiation of the Brain. In: *Neurosciences Research Program*; 1977; Massachusetts: MIT; 1977. p. 81-147.
13. Grossman CJ, Roselle GA. The interrelationship of the HPG-thymic axis and immune system regulation. *J Steroid Biochem* 1983;19(1B):461-7.
14. Besedovsky H, Sorkin E, Felix D, Haas H. Hypothalamic changes during the immune response. *Eur J Immunol* 1977;7(5):323-5.

15. Besedovsky HO, del Rey A. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocr Rev* 1996;17(1):64-102.
16. Dorner G, Staudt J. Structural changes in the preoptic anterior hypothalamic area of the male rat, following neonatal castration and androgen substitution. *Neuroendocrinology* 1968;3(3):136-40.
17. Corbier P, Roffi J, Rhoda J. Female sexual behavior in male rats: effect of hour of castration at birth. *Physiol Behav* 1983;30(4):613-6.
18. Chowen JA, Argente J, Gonzalez-Parra S, Garcia-Segura LM. Differential effects of the neonatal and adult sex steroid environments on the organization and activation of hypothalamic growth hormone- releasing hormone and somatostatin neurons. *Endocrinology* 1993;133(6):2792-802.
19. Madeira MD, Lieberman AR. Sexual dimorphism in the mammalian limbic system. *Prog Neurobiol* 1995;45(4):275-333.
20. Patchev VK, Hayashi S, Orikasa C, Almeida OF. Implications of estrogen-dependent brain organization for gender differences in hypothalamo-pituitary-adrenal regulation. *FASEB J* 1995;9(5):419-23.
21. McEwen BS. Protective and damaging effects of stress mediators: central role of the brain. *Prog Brain Res* 2000;122:25-34.
22. McEwen BS. Steroid hormones: effect on brain development and function. *Horm Res* 1992;37(Suppl 3):1-10.
23. Babichev VN, Shishkina IV, Peryshkova TA. The effect of neonatal castration of male rats on the level of sex- hormone receptors in the hypothalamus and hypophysis of adult animals. *Biomed Sci* 1990;1(2):189-92.
24. Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH. Sepsis and septic shock--a review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res* 1980;29(2):189-201.
25. Jekel J, Elmore J, Katz D. Análise bivariada. In: Jekel J, Elmore J, Katz D, editors. *Epidemiologia, bioestatística e medicina preventiva*. Porto Alegre: Artes Médicas; 1999. p. 155-77.
26. Johnson R, Wichern D. Clustering, distance methods and ordination. In: *Applied multivariate statistical analysis*. 4 ed. New Jersey: Prentice Hall; 1998. p. 770-99.
27. Teplick R, Rubin R. Therapy of sepsis: why have we made such little progress? *Crit Care Med* 1999;27(8):1682-3.
28. Ortellado DK, D'Acampora AJ, Souza EJ, Gerente MM. Sobrevida após peritonite por perfuração de víscera oca em ratos wistar. In: 6° Congresso Brasileiro da Ciência de Animais de Laboratório; 1998; Porto Alegre; 1998. p. 38.
29. Deitch EA. Animal models of sepsis and shock: a review and lessons learned. *Shock* 1998;9(1):1-11.
30. Fink MP, Heard SO. Laboratory models of sepsis and septic shock. *J Surg Res* 1990;49(2):186-96.
31. Otero-Anton E, Gonzalez-Quintela A, Lopez-Soto A, Lopez-Ben S, Llovo J, Perez LF. Cecal ligation and puncture as a model of sepsis in the rat: influence of the puncture size



- on mortality, bacteremia, endotoxemia and tumor necrosis factor alpha levels. *Eur Surg Res* 2001;33(2):77-9.
32. Baker CC, Chaudry IH, Gaines HO, Baue AE. Evaluation of factors affecting mortality rate after sepsis in a murine cecal ligation and puncture model. *Surgery* 1983;94(2):331-5.
  33. Offner PJ, Moore EE, Biffl WL. Male gender is a risk factor for major infections after surgery. *Arch Surg* 1999;134(9):935-8; discussion 938-40.
  34. Oberholzer A, Keel M, Zellweger R, Steckholzer U, Trentz O, Ertel W. Incidence of septic complications and multiple organ failure in severely injured patients is sex specific. *J Trauma* 2000;48(5):932-7.
  35. Yesilova Z, Ozata M, Kocar IH, Turan M, Pekel A, Sengul A, et al. The effects of gonadotropin treatment on the immunological features of male patients with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85(1):66-70.
  36. Beeson PB. Age and sex associations of 40 autoimmune diseases. *Am J Med* 1994;96(5):457-62.
  37. Butterworth M, McClellan B, Allansmith M. Influence of sex in immunoglobulin levels. *Nature* 1967;214(94):1224-5.
  38. Ansar AS, Talal N. Sex hormones and autoimmune rheumatic disorders. *Scand J Rheumatol* 1989;18(2):69-76.
  39. Brick JE, Wilson DA, Walker SE. Hormonal modulation of responses to thymus-independent and thymus-dependent antigens in autoimmune NZB/W mice. *J Immunol* 1985;134(6):3693-8.
  40. Giltay EJ, Fonk JC, von Blomberg BM, Drexhage HA, Schalkwijk C, Gooren LJ. In vivo effects of sex steroids on lymphocyte responsiveness and immunoglobulin levels in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85(4):1648-57.
  41. Graff RJ, Lappe MA, Snell GD. The influence of the gonads and adrenal glands on the immune response to skin grafts. *Transplantation* 1969;7(2):105-11.
  42. Lahita RG. Gender and the immune system. *J Gend Specif Med* 2000;3(7):19-22.
  43. Kovacs WJ, Olsen NJ. Androgen receptors in human thymocytes. *J Immunol* 1987;139(2):490-3.
  44. Da Silva JA. Sex hormones, glucocorticoids and autoimmunity: facts and hypotheses. *Ann Rheum Dis* 1995;54(1):6-16.
  45. Besedovsky HO, del Rey AE, Sorkin E. Immune-neuroendocrine interactions. *J Immunol* 1985;135(2 Suppl):750s-754s.
  46. Shanks N, Larocque S, Meaney MJ. Neonatal endotoxin exposure alters the development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: early illness and later responsivity to stress. *J Neurosci* 1995;15(1 Pt 1):376-84.
  47. Hiemke C, Banger M, Kohsik R, Hundt M, Ghraf R. Actions of sex hormones on the brain. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 1992;16(3):377-88.

48. del Rey A, Furukawa H, Monge-Arditi G, Kabiersch A, Voigt KH, Besedovsky HO. Alterations in the pituitary-adrenal axis of adult mice following neonatal exposure to interleukin-1. *Brain Behav Immun* 1996;10(3):235-48.
49. Rife SU, Marquez MG, Escalante A, Velich T. The effect of testosterone on the immune response. 1. Mechanism of action on antibody-forming cells. *Immunol Invest* 1990;19(3):259-70.
50. Wilson CA, Mrose SA, Thomas DW. Enhanced production of B lymphocytes after castration. *Blood* 1995;85(6):1535-9.
51. Viau V, Meaney MJ. The inhibitory effect of testosterone on hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress is mediated by the medial preoptic area. *J Neurosci* 1996;16(5):1866-76.
52. Wichmann MW, Ayala A, Chaudry IH. Male sex steroids are responsible for depressing macrophage immune function after trauma-hemorrhage. *Am J Physiol* 1997;273(4 Pt 1):C1335-40.
53. Viselli SM, Stanziale S, Shults K, Kovacs WJ, Olsen NJ. Castration alters peripheral immune function in normal male mice. *Immunology* 1995;84(2):337-42.
54. De Azevedo RB, Rosa LF, Lacava ZG, Curi R. Gonadectomy impairs lymphocyte proliferation and macrophage function in male and female rats. Correlation with key enzyme activities of glucose and glutamine metabolism. *Cell Biochem Funct* 1997;15(4):293-8.
55. Da Silva JA. Sex hormones and glucocorticoids: interactions with the immune system. *Ann N Y Acad Sci* 1999;876:102-17; discussion 117-8.
56. Shanks N, Lightman SL. The maternal-neonatal neuro-immune interface: are there long-term implications for inflammatory or stress-related disease? *J Clin Invest* 2001;108(11):1567-73.
57. Kelly DD. Sexual Differentiation of the Nervous System. In: Kelly DD, editor. *Principles of Neural Science*. Third ed. Norwalk: Prentice Hall; 1997. p. 959-73.

## **NORMAS ADOTADAS**

1. Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – Os princípios éticos da experimentação.
2. d'Acampora, AJ – Investigação experimental – do planejamento à redação final – 1.<sup>a</sup> edição, Florianópolis, Papa Livros, 2001. 81 p.
3. DeCS – Descritores em Ciência da Saúde. São Paulo, Bireme, 1992. 1111p.
4. International committee on veterinary gross anatomical nomenclature – Nomina anatomica veterinaria. 3 ed. New York, Ithaca, 1983. 216p.
5. International Committee of Medical Journal Editors. Uniforme requirements for manuscripts submitted to biomedical journal. Ann Intern Med 1997: 126:36.

## **ANEXO**

# INDUÇÃO DA SEPSE

## Ligadura e perfuração cecal

Cirurgião: \_\_\_\_\_

Identificação do animal:

Peso (g)

Data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Sexo:	<input type="checkbox"/> Macho	<input type="checkbox"/> Fêmea
	<input type="checkbox"/> Macho castrado	<input type="checkbox"/> Macho castrado com reposição

CIRURGIA TEMPO PARA	
Hora <input type="text"/>	Min <input type="text"/>

ÓBITO	
Horas <input type="text"/>	Min <input type="text"/>
Em Minutos	<input type="text"/>

ÓBITO	
Hora <input type="text"/>	Min <input type="text"/>
Data: / /	

Intercorrências: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Observações: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

## **APÊNDICE**

## BASE DE DADOS

Rato	Grupo	Óbito	Tempo óbito	Tempo óbito	Tempo óbito
			Hora/média	Hora+minutos	Minutos
			T_hs		T_min
1	M	1	9,81	9,49	589
2	M	1	9,9	9,54	594
3	M	1	21,5	21,3	1290
4	M	1	12,36	12,22	742
5	M	1	14,41	14,25	865
6	M	1	11,7	11,42	702
7	M	1	6,91	6,55	415
8	M	1	17,8	17,48	1068
9	M	1	10,61	10,37	637
10	M	1	7,76	7,46	466
1	MCR	1	23,5	23,3	1410
2	MCR	0			
3	MCR	1	12,91	12,55	775
4	MCR	1	11,03	11,02	662
5	MCR	1	85	85	5155
6	MCR	1	10,76	10,46	646
7	MCR	1	10,73	10,44	644
8	MCR	1	8,25	8,15	495
9	MCR	1	7,91	7,55	475
10	MCR	1	8,11	8,07	487

**Legendas grupos:**

**M: Machos**

**MCR: Macho castrado com reposição de testosterona**

**Legendas óbito:**

**0 - não óbito**

**1 - óbito até 24 horas**

**2 - óbito após 24 horas**

## BASE DE DADOS

			Tempo óbito	Tempo óbito	Tempo óbito
			Hora/média	Hora+minutos	Minutos
Rato	Grupo	Óbito	T hs		T_min
1	MC	0			
2	MC	1	12,61	12,37	757
3	MC	1	10,16	10,1	610
4	MC	1	10,36	10,22	622
5	MC	2	52,23	52,14	3134
6	MC	1	11,5	11,3	690
7	MC	1	10,71	11,43	703
8	MC	2	37,6	37,36	2256
9	MC	2	30,88	30,53	1853
10	MC	0			
1	F	0			
2	F	1	8,93	8,56	536
3	F	0			
4	F	2	34,13	34,08	2048
5	F	2	47,36	47,22	2842
6	F	0			
7	F	1	21,83	21,5	1310
8	F	1	9,53	9,32	572
9	F	2	58,91	58,55	3535
10	F	2	40,8	40,48	2448

**Legendas grupos:**

MC: Macho castrado

F: Fêmeas

**Legendas óbito:**

0 - não óbito

1 - óbito até 24 horas

2 - óbito após 24 horas