

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

O efeito do consumo crônico de etanol na quimiotaxia de neutrófilos durante a aspergilose pulmonar

Nathália Luísa Sousa de Oliveira Malacco

ORIENTADOR: Prof. Dr. Frederico Marianetti Soriani

BELO HORIZONTE
JUNHO - 2016

NATHÁLIA LUÍSA SOUSA DE OLIVEIRA MALACCO

O efeito do consumo crônico de etanol na quimiotaxia de neutrófilos durante a aspergilose pulmonar

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre pelo programa de Pós-Graduação em Genética, Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Frederico Marianetti Soriani

BELO HORIZONTE

JUNHO - 2016

043 Malacco, Nathália Luísa Sousa de Oliveira.
O efeito do consumo crônico de etanol na quimiotaxia de neutrófilos durante a aspergilose pulmonar [manuscrito] / Nathália Luísa Sousa de Oliveira Malacco. – 2016.

94 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Frederico Marianetti Soriani.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Etanol. 2. Alcoolismo. 3. Pneumopatias Fúngicas. 4. Aspergilose Pulmonar. 5. *Aspergillus fumigatus*. 6. Neutrófilos. 7. Quimiotaxia. I. Soriani, Frederico Marianetti. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 575



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO

**Nathalia Luisa Sousa de Oliveira
Malacco**

232/2016
entrada
2º/2014
CPF:
094.568.236-01

Às quatorze horas do dia **30 de junho de 2016**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora de Dissertação, indicada pelo Colegiado de Programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: "**O efeito do consumo crônico de etanol na quimiotaxia de neutrófilos durante a aspergilose pulmonar**", requisito para obtenção do grau de Mestre em **Genética**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Dr. Frederico Marianetti Soriani**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	CPF	Indicação
Dr. Frederico Marianetti Soriani	UFMG		Aprovada
Dr. Álvaro Cantini Nunes	UFMG		Aprovada
Dra. Daniele da Glória de Souza	UFMG	03363374690	Aprovada.

Pelas indicações, a candidata foi considerada: APROVADA
O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.
Belo Horizonte, 30 de junho de 2016.

Dr. Frederico Marianetti Soriani - Orientador _____
Dr. Álvaro Cantini Nunes Álvaro Cantini Nunes
Dra. Daniele da Glória de Souza Daniele da Glória de Souza

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha querida família!

Aos meus pais, Maria e Sílvio.

Aos meus irmãos, Ana e Sílvio.

Muito obrigada por todo o apoio, carinho, confiança e amor em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

A Deus toda glória. Ao Cruzeiro também.

Ao Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, que tem sido minha casa e um dos meus lugares preferidos em Belo Horizonte desde 2010/1.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética, bem como aos colegas, funcionários e professores deste programa. Obrigada pela convivência e aprendizado.

Às agências de fomento, CNPq, CAPES e FAPEMIG pelo suporte financeiro.

A todas as pessoas do grupo Imunofar. Em especial, aos professores Mauro Teixeira, Vanessa Pinho, Daniele Souza, Milene Rachid e Remo Russo. Agradeço também à Paty Campi, ao Lucas (cuei) e à Frank. Muito obrigada por toda solicitude, apoio e aprendizagem.

Agradeço com imenso carinho ao meu orientador, Professor Dr. Frederico Marianetti Soriani (Fred GuilheRme hehe), pela oportunidade, pela confiança, pelo exemplo, pela amizade, pela paciência, por me inspirar em vários momentos da minha carreira e principalmente, por acreditar em mim e me fazer sentir capaz de ir além.

Agradeço às meninas mais lindas desse mundo: Isabella (Bebella), Jéssica (Amandinha) e Karina (Karinete). Muito mais do que colegas de trabalho, vocês são minhas amigas! Vocês, juntamente com o Fred, fazem do nosso Laboratório de Genética Funcional a FAMÍLA LGF. Obrigada pelo carinho, apoio, correções de texto, ajuda com figuras, danças, cantorias e por me ajudarem a segurar esse tchan! Se eu chequei até aqui, é por mérito de vocês também.

Agradeço também as pessoas especiais que saíram do LGF, mas nunca do meu coração: Marina (Marinex), que foi para mim uma irmã mais velha no mestrado, me ajudou em vários momentos, meu deu conselhos, e se abriu para mim, tornando-se uma amiga muito importante. Welinton (Érson), não tenho palavras para expressar o quanto eu gosto de você e o quanto te conhecer fez toda a diferença na minha vida. Você, com seu jeito engraçado e meigo, me fez sentir em casa em um momento difícil e desafiador, o início da minha jornada no LGF. Você conquistou minha amizade para sempre!

Aos meus amigos das Ciências Biológicas, dos quais sinto saudades imensas, em especial àqueles que sei que sempre torceram por mim, Sol, Alison, Nina, Enigma (Paulo), Pablo,

Priscila, Poly, Maísa e Duda. Muito obrigada pelo carinho. Aos meus amigos da História, que me acolheram tão bem e hoje são pessoas muito importantes na minha vida. Obrigada pela força!

A minha querida amiga Aninha, minha “siamesa” na Bio. Eu não poderia agradecer pela sua presença, apoio, ajuda e carinho só no mestrado. Nossa história começou bem antes disso, no cursinho, e passou por todas as disciplinas que fizemos juntas, saídas de campo e trabalhar no mesmo lab. Sou muito grata por tudo e estou muito feliz por termos dado um jeito de trabalhar juntas de novo. Eu saí do LAGI, mas o LAGI não saiu de mim!

A minha grande amiga Mari. Ter você em todos os momentos da minha vida estando do meu lado e torcendo por mim é tudo! Obrigada por fazer parte da minha história.

Às minhas queridas famílias Oliveira, Sousa e Malacco, que sempre estiveram torcendo muito por mim e vibrando com as minhas vitórias. Orgulho-me muito de fazer parte de todas elas.

Aos meus pais, Maria Sousa e Sílvia Oliveira, pelo amor, apoio, amparo nos momentos difíceis. Obrigada por serem compreensíveis e me darem tudo que precisei, para que eu conseguisse concluir mais esse objetivo. Amo vocês!

Ao meu marido e maior incentivador Felipe Silveira de Oliveira Malacco. O historiador que mais entende de Genética, Imunologia e Microbiologia nesse mundo! Sua presença e dedicação foram fundamentais em todos os passos dessa caminhada. Obrigada de todo o meu coração por tudo e por acreditar em mim, mesmo quando eu não acreditava. Te amo miau!

Às pessoas que mais amo no mundo, meus irmãos Ana (BanAna) e Sílvia (DesnecesSílvia). Deus os colocou em minha vida e o agradeço todos os dias por isso. Obrigada pela convivência, pelo amor, pelo apoio, por serem vocês! We have the good genes!

À minha querida e amada Bebel, sem ela as madrugadas seriam mais solitárias, os meus risos menos alegres e a minha vida menos feliz. Meu mais sincero miau!

Agradeço a todas as pessoas que, de alguma forma, participaram da realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	I
LISTA DE FIGURAS	II
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	III
RESUMO	1
ABSTRACT	2
1 INTRODUÇÃO.....	3
1.1 O alcoolismo e a modulação da resposta imune e inflamatória	3
1.1.1 O alcoolismo	3
1.1.2 O efeito do consumo de etanol no organismo	4
1.2 Respostas imune e inflamatória frente ao <i>Aspergillus fumigatus</i>	8
1.2.1 O microrganismo <i>Aspergillus fumigatus</i>	8
1.2.2 Patogênese e aspectos imunológicos da aspergilose	10
1.3 Importância dos neutrófilos na inflamação.....	13
2 JUSTIFICATIVA.....	17
3 OBJETIVO	18
3.1 Objetivo Geral	18
4 METODOLOGIA	19
4.1 Animais experimentais	19
4.2 Modelo de alcoolismo	19
4.3 Dosagem de etanol no sangue	19
4.4 Cultivo, preparo do inóculo e infecção via intranasal de <i>A. fumigatus</i>	20
4.5 Análise da sobrevivência e alteração de peso corpóreo de camundongos infectados por <i>A. fumigatus</i>	21
4.6 Determinação de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) nos pulmões de animais infectados com <i>A. fumigatus</i>	21
4.7 Análises histopatológicas	21
4.8 Lavado broncoalveolar (BAL)	22
4.9 Contagem total e diferencial das células do BAL.....	22
4.10 Avaliação da atividade de mieloperoxidase (MPO).....	22
4.11 Avaliação da atividade de N-acetilglicosaminidase (NAG).....	23
4.12 Avaliação da atividade de peroxidase eosinofílica (EPO)	24
4.13 Quantificação de citocinas e quimiocinas por ELISA	24
4.14 Leucograma	25
4.15 Quantificação de proteínas.....	25
4.16 Microscopia intravital	26

4.17 Citometria de fluxo	27
4.18 Análise estatística	28
5 RESULTADOS	29
5.1 Parâmetros relacionados ao consumo de etanol	29
5.1.1 O consumo crônico de etanol não altera o peso corpóreo dos animais durante o tratamento	29
5.1.2 O modelo murino de alcoolismo reproduz os mesmos níveis plasmáticos de álcool em humanos e não causa lesão hepática nos animais	31
5.2 O consumo crônico de etanol modula a resposta imune e inflamatória após infecção por <i>A. fumigatus</i>	32
5.2.1 O consumo crônico de etanol resultou em uma maior susceptibilidade após desafio com <i>A. fumigatus</i>	32
5.2.2 A susceptibilidade dos camundongos consumistas de etanol foi associada à presença de carga fúngica elevada no pulmão após infecção	34
5.2.3 O consumo crônico de etanol prejudica o influxo de neutrófilos e de linfócitos nos pulmões e nos alvéolos após infecção por <i>A. fumigatus</i>	37
5.2.4 Animais alcoolistas tiveram uma maior lesão pulmonar nas análises histológicas	41
5.2.5 O consumo de etanol não altera a permeabilidade vascular e nem a quantidade de leucócitos no sangue circulante	44
5.2.6 O consumo crônico de etanol altera a concentração de mediadores inflamatórios após desafio com <i>A. fumigatus</i>	46
5.2.7 O consumo de etanol afeta o número de diferentes subtipos de linfócitos T no sítio da infecção	49
5.2.8 A deficiência no recrutamento de neutrófilos nos camundongos alcoolistas é associada ao menor rolamento e adesão dessas células às vênulas pós-capilares	51
5.2.9 A deficiência na migração de neutrófilos em animais consumistas crônicos de etanol após infecção por <i>A. fumigatus</i> parece estar relacionada com a menor expressão de CXCR2 na membrana dos neutrófilos circulantes do sangue	54
6 DISCUSSÃO	56
7 CONCLUSÃO	64
8 REFERÊNCIAS	65
9 ANEXOS	72

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Ilustração 1. Vias de metabolismo do etanol	5
Ilustração 2. Morfologia dos conidióforos e conídios de <i>A. fumigatus</i>	9
Ilustração 3. Migração de neutrófilos para o tecido.....	14
Ilustração 4. Exposição do músculo cremaster para filmagem no experimento de microscopia intravital	27
Ilustração 5. Mecanismo relacionados à falha de migração de neutrófilos para os alvéolos nos animais alcoolistas.....	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Quantidade de etanol ingerida pelos camundongos, peso corpóreo e níveis de glicose durante o tratamento.....	30
Figura 2. Níveis de etanol e lesão hepática após o tratamento com etanol	31
Figura 3. Animais alcoolistas são mais susceptíveis à infecção pulmonar por <i>A. fumigatus</i>	33
Figura 4. Animais consumistas de álcool possuem uma deficiência no clearance de <i>A. fumigatus</i>	35
Figura 5. Animais consumistas de álcool apresentaram carga fúngica elevada no pulmão	36
Figura 6. Camundongos alcoolistas apresentaram alteração no infiltrado inflamatório para o espaço alveolar após infecção com <i>A. fumigatus</i>	38
Figura 7. Animais que consumiram álcool cronicamente apresentaram redução da migração de neutrófilos para o parênquima pulmonar após um dia de infecção com <i>A. fumigatus</i>	40
Figura 8. A infecção pelo fungo <i>A. fumigatus</i> resultou em lesão inflamatória pulmonar exacerbada nos animais EtOH	42
Figura 9. O tratamento com etanol não afetou a permeabilidade vascular nos animais	44
Figura 10. O consumo crônico de EtOH não afeta a quantidade de leucócitos circulantes no sangue de camundongos.....	45
Figura 11. O consumo crônico de etanol altera a concentração de mediadores inflamatórios após desafio com <i>A. fumigatus</i>	48
Figura 12. O consumo de etanol afeta o número de diferentes subtipos de linfócitos T no sítio da infecção	50
Figura 13. Camundongos consumistas de etanol apresentam menor rolamento e adesão de leucócitos ao endotélio vascular	52

LISTA DE ABREVIATURAS

(NH₄)₂SO₄ – Sulfato de amônio

°C – Grau celsius

µg – Micrograma

µL – Microlitro

µL – Microlitro

µm – Micrômetro

µM – Micromolar

ABPA – aspergilose broncopulmonar alérgica

ADH – álcool desidrogenase

ALDH – aldeído desidrogenase

ALT – alanina amino transferase

ANOVA – Análise de variância

BAL – Lavado broncoalveolar – do inglês, *Bronchoalveolar lavage fluid*

BSA – Albumina sérica bovina

C₆H₈O₇ – Ácido cítrico

CEUA – Comitê de Ética em Pesquisa Animal

CLR – Receptor de lectina tipo C

CO₂ – Dióxido de carbono

CYP2E1 – citocromo microssomal P450 2E1

D.O. – Densidade óptica

DALs – doenças alcoólicas hepáticas

dL – Decilitro

DL – Dose letal

DMSO – Dimetilsulfóxido

DPOC – doença crônica obstrutiva pulmonar

EDTA – Ácido etilendiaminotetraacético

ELISA – Ensaio de imunoadsorção ligado a enzima

EPO – Peroxidase eosinofílica

EtOH – Etanol

FDA – do inglês, *Food and Drug Administration*

g – Grama

G-CSF – fator estimulador de colônias granulócitos, do inglês, *Granulocyte-colony stimulating factor*

GM-CSF – fator estimulador de colônias granulócitos e macrófagos

GMS – Metenamina de prata de Grocott, do inglês, *Grocott's methenamine silver*

GPCR – receptores acoplados à proteína G
H₂O – Água
H₂O – água
H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
H₂SO₄ – Ácido sulfúrico
HCl – Ácido clorídrico
HTAB – Brometo de hexadeciltrimetilamônio
i.n. – Intranasal
i.p. – intraperitoneal
i.v. – Intravenosa
ICAM – Molécula de adesão intercelular
IL – Interleucina
INPAD – Instituto Nacional de Ciência de Tecnologia para Políticas Públicas do Alcool e Outras Drogas
Kg – Quilograma
L – Litro
LPS – Lipopolissacarídeo
LTB₄ – leucotrieno B₄
m – Metro
M – Molar
mg – Miligrama
min – Minuto
MIP – proteína inflamatória de macrófagos
mL – Mililitro
mm – Milímetro
mM – Milimolar
MPO – Mieloperoxidase
Na₂HPO₄ – Fosfato de sódio dibásico
NaCl – Cloreto de sódio
NaEDTA – Acetato dissódio tetraetilenodiamina
NAG – N-acetilglicosaminidase
NaPO₄ – Fosfato de sódio
NETs – do inglês, *neutrophil's extracellular traps*
NF-κB – Fator nuclear kappa B
ng – Nanograma
NKT – células T *natural killer*
nm – Nanômetro

NO – Óxido nítrico

OMS – Organização Mundial da Saúde

OPD – O-fenilenodiamina

p/v – Peso por volume

PAF – fator de agregação plaquetária

PAMPs – Padrões moleculares associados a patógenos, do inglês, *Pathogen-associated molecular patterns*

PBS – Solução salina tamponada, do inglês, *Phosphate-buffered saline*

pg – Picogramas

pH – Potencial hidrogeniônico

PMN – (leucócito) polimorfonuclear

PMSF – do inglês, *phenylmethylsulphonyl fluoride*

PRRs – Receptores de reconhecimento de padrões, do inglês, *Pattern recognition receptors*

ROS – espécies reativas de oxigênio

rpm – Rotações por minuto

s – Segundo

SDRA – síndrome da dificuldade respiratória aguda

SPF – Livre de patógenos específicos – do inglês, *Specific pathogen free*

TBC – tuberculose

Th – T helper

TLR – Receptor do tipo Toll, do inglês, *Toll-like receptors*

TMB – 3,3'-5,5'-tetrametilbenzidina

TNF – Fator de necrose tumoral

UFC – Unidade formadora de colônia

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

v/v – Volume por volume

VCAM – Molécula de adesão celular-vascular

VSR – vírus sincicial respiratório

YAG – do inglês, *Yeast extract-agar-glucose*

RESUMO

O alcoolismo é uma doença crônica grave que tem alta taxa de morbidade e mortalidade na população mundial. Além disso, o consumo crônico de álcool está associado ao comprometimento da resposta imune e aumento da susceptibilidade a infecções pulmonares. Em relação às infecções pulmonares, a incidência de pneumonias fúngicas causadas por *Aspergillus fumigatus* tem crescido nas últimas décadas. Esse tipo de infecção ocorre após a inalação dos conídios dispersos pelo ar, que se depositam nos espaços alveolares, o que culmina na ativação dos macrófagos e iniciação de uma resposta inflamatória. Nesse sentido, nosso objetivo foi caracterizar como o consumo crônico de álcool altera as respostas imune e inflamatória a uma infecção pulmonar fúngica, durante a aspergilose pulmonar. Camundongos com cinco semanas foram tratados com água ou com uma solução de etanol (20% v/v) durante 12 semanas. Após o tratamento, os animais foram infectados via intranasal com 3×10^8 conídios de *A. fumigatus*. Os animais foram eutanasiados com um e dois de infecção, e foram coletados o lavado broncoalveolar (BAL), sangue e pulmões. Os resultados gerados demonstraram que a exposição crônica ao etanol causou maior mortalidade associada a uma maior perda de peso em comparação ao grupo controle. A análise histológica demonstrou maior lesão pulmonar acompanhada de maior carga fúngica nos pulmões. Além disso, o tratamento com etanol não alterou a quantidade de leucócitos circulantes, mas promoveu uma grande diminuição de migração de neutrófilos para os alvéolos pulmonares. Na análise de mediadores inflamatórios, foi observado que o consumo de etanol causou desbalanço na produção de citocinas pró- e anti-inflamatórias e moléculas quimioatraentes após a infecção. Os níveis de TNF- α e C5a são semelhantes entre os grupos, enquanto os níveis de IL-1 β e IL-10 foram menores nos animais consumistas de álcool. Já a quimiocina CXCL2 está aumentada nos animais alcoolistas após infecção. Curiosamente, os níveis da quimiocina CXCL1/KC no BAL são semelhantes em ambos os grupos. No entanto, os níveis séricos de CXCL1 são extremamente elevados nos animais expostos ao etanol, quadro observado comumente em casos de sepse severa. Posteriormente foi encontrado que a falha na migração de neutrófilos para as vias aéreas ocorreu devido a menor expressão do receptor de quimiocinas CXCR2. Além disso, a diminuição da resposta Th17 e a redução dos processos de rolamento e adesão de leucocitária também foram associadas a esse fenótipo. Sendo assim, os resultados deste trabalho apontam para uma alteração na regulação da resposta imune inata no controle do fungo *A. fumigatus*, frente a um quadro de alcoolismo, e que envolve os mecanismos de quimiotaxia de neutrófilos e confere maior susceptibilidade à infecção fúngica.

ABSTRACT

Alcoholism is a worldwide chronic disease with high morbidity and mortality rates. Chronic alcohol consumption is associated with impaired immune response and increased susceptibility to lung infectious diseases. Regarding to pulmonary infections, the incidence of fungal pneumonia caused by *Aspergillus fumigatus* has increased in the last decades. Infection occurs after inhalation of airborne conidia, followed by alveolar colonization, which results in macrophage activation and initiation of a proinflammatory response. In this sense, our objective was to characterize how chronic alcohol consumption alters the immune and inflammatory response to fungal lung infection during pulmonary aspergillosis. Five weeks old, C57BL/6 mice, were treated with water or ethanol (20% v/v) in drinking water for 12 weeks. After treatment, animals were intranasally infected with 3×10^8 *A. fumigatus* conidia. Mice were euthanized one and two days after infection and bronchoalveolar lavage fluid (BALF), blood and lungs were collected. Results showed that chronic exposure to ethanol caused higher mortality associated with higher weight loss compared to the control group. Histological analysis demonstrated more severe pathological score with higher fungal load in lungs. In addition, bone marrow derived leukocytes were not affected by chronic ethanol consumption. Moreover, neutrophils migration to the alveoli was reduced after alcohol treatment. Analysis of inflammatory mediators, demonstrated that ethanol consumption generated an imbalance in proinflammatory and anti-inflammatory cytokines and chemoattractant molecules production, after infection. TNF and C5a levels had similar levels between groups, while IL-1 β and IL-10 had lower levels in alcohol consuming mice. Related to CXCL2 chemokine, we observed an increase in its levels in ethanol treated mice after infection. Interestingly, levels of CXCL1/KC in BAL were similar in both groups. However, serum CXCL1 levels were extremely higher in animals exposed to ethanol, a characteristic generally associated with severe sepsis. Our results also demonstrated that the failure of neutrophil migration into airways was due to lower expression of the CXCR2 chemokine receptor. Moreover, the reduction of Th17 response and rolling and adherence of leukocyte were also associated with this phenotype. Taken together, results point to an altered regulation of the innate immune response during *A. fumigatus* infection, caused by chronic ethanol intake, and this phenotype involves a neutrophils chemotaxis mechanism that confers increased susceptibility to fungal infection.

1 INTRODUÇÃO

1.1 O alcoolismo e a modulação da resposta imune e inflamatória

1.1.1 Alcoolismo

O álcool (álcool etílico ou etanol) é uma das drogas psicotrópicas que tem seu consumo admitido e até incentivado. Apesar de sua ampla aceitação social, o consumo de bebidas alcoólicas, quando em excesso, torna-se prejudicial tanto para o indivíduo quanto para a sociedade (AL-ABDALLAT et al., 2016; GILMORE et al., 2016). O alcoolismo, também chamado de desordem no uso de álcool, está relacionado a um descontrole no consumo de álcool e é considerado uma doença crônica e debilitante. Tem como características a busca compulsiva do álcool, a perda de controle em relação ao seu consumo, o aparecimento de estados emocionais negativos, como a frustração, raiva, ansiedade, depressão ou o tédio, quando seu acesso é interrompido, e também o risco de recaída, mesmo após longos períodos de tempo sem o consumo dessa droga. O consumo de álcool é um fenômeno global e que causa danos sociais, econômicos e de saúde (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013).

A quantidade e o padrão de consumo de álcool variam enormemente entre os consumidores, entre os países e dentro dos países. Os níveis de consumo em um país são tipicamente apresentados como o volume de álcool puro consumido por adulto (pessoa acima de 15 anos) por ano. Os dados globais mais recentes são de 2010, publicado pela Organização Mundial de Saúde (OMS), que mostram que os maiores níveis de consumo per capita são vistos em toda a Europa Oriental e Rússia e os níveis mais baixos em todos os países predominantemente islâmicos do Norte da África, Oriente Médio e Sudeste Asiático. O consumo anual per capita é de 11,6 litros no Reino Unido, 12,2 litros na Austrália, 10,2 litros no Canadá e 9,2 litros no EUA (GILMORE et al., 2016). Já no Brasil, os níveis de consumo em 2010 chegaram a 8,7 litros. Dados do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Políticas Públicas do Álcool e Outras Drogas (INPAD) em 2012, revelaram que 15,5% de indivíduos dentro da faixa etária de 18 a 24 anos, são dependentes de álcool (GALDURÓZ; CAETANO, 2004). O alcoolismo se encontra intimamente correlacionado com a incidência de doenças, principalmente, psíquicas, hepáticas e cardíacas, representado por 10% dos problemas totais de saúde no Brasil (BABOR, 2010; MELONI; LARANJEIRA, 2004).

O abuso crônico de álcool gera custos de aproximadamente 223 bilhões de dólares na economia dos Estados Unidos da América (EUA) e causa mais de 79.000 mortes a cada ano. Nos últimos 20 anos, o alcoolismo passou de oitavo para quinto principal fator de risco

para a mortalidade precoce e incapacidade na população mundial, sendo que a mortalidade em todo o mundo chega a ser 30 vezes maior que nos EUA, sendo aproximadamente 2,5 milhões de mortes. Esse número passou para cerca de 3,3 milhões em 2012, segundo a OMS (KARAVITIS et al., 2013). Além disso, cerca de 500 milhões de pessoas se encontram dentro dos critérios de dependência alcoólica em todo o mundo (COOK, 1998; KAPHALIA; CALHOUN, 2013).

1.1.2 O efeito do consumo de etanol no organismo

O etanol é uma molécula pequena, com absorção relativamente lenta pelo estômago e absorção mais rápida pelo intestino. Por ser solúvel em água, ele acessa rapidamente a corrente sanguínea, de onde é livremente distribuído para a maioria dos órgãos e sistemas. O coração, o cérebro e os músculos estão sujeitos às mesmas concentrações de álcool do sangue. A exceção é o fígado, que fica sujeito a concentrações maiores, uma vez que recebe o etanol absorvido do estômago e do intestino. O fígado é um órgão particularmente susceptível aos danos provocados pelo álcool, pois ele é o principal sítio de metabolização desta substância no organismo. A grande maioria do álcool consumido é metabolizada por este órgão, mas cerca de 2 a 10% do álcool ingerido é metabolizado e eliminado pelos rins e pulmões. O primeiro passo no metabolismo do álcool é a rápida oxidação à acetaldeído pela enzima denominada álcool desidrogenase (ADH). Esta enzima converte o álcool em acetaldeído que, mesmo em pequenas concentrações, é tóxico para o organismo. A enzima aldeído desidrogenase (ALDH), por sua vez, converte o acetaldeído em acetato. A maior parte do acetato produzido atinge outras partes do organismo pela corrente sanguínea onde participa de outros ciclos metabólicos. O álcool também pode ser metabolizado pelo citocromo microssomal P450 2E1 (CYP2E1) e pela via da catalase peroxissomal para acetaldeído, tanto no fígado quanto nos pulmões (Ilustração 1), conferindo mecanismo alternativo de metabolismo, que é particularmente induzido durante o abuso crônico de álcool e é responsável pela produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). O estresse oxidativo está associado à oxidação de proteínas, lipídeos e DNA que afetam a homeostase celular. Portanto, o estabelecimento de uma causa e efeito de inter-relação entre a toxicidade e estresse oxidativo poderia proporcionar uma melhor compreensão da indução da lesão pulmonar (KAPHALIA; CALHOUN, 2013; KOOP, 2006; YEH et al., 2007). Através de cada uma destas vias, o etanol produz específicas perturbações metabólicas e tóxicas, e todas as três vias resultam na produção de acetaldeído, um metabólito altamente tóxico (LIEBER, 2005).

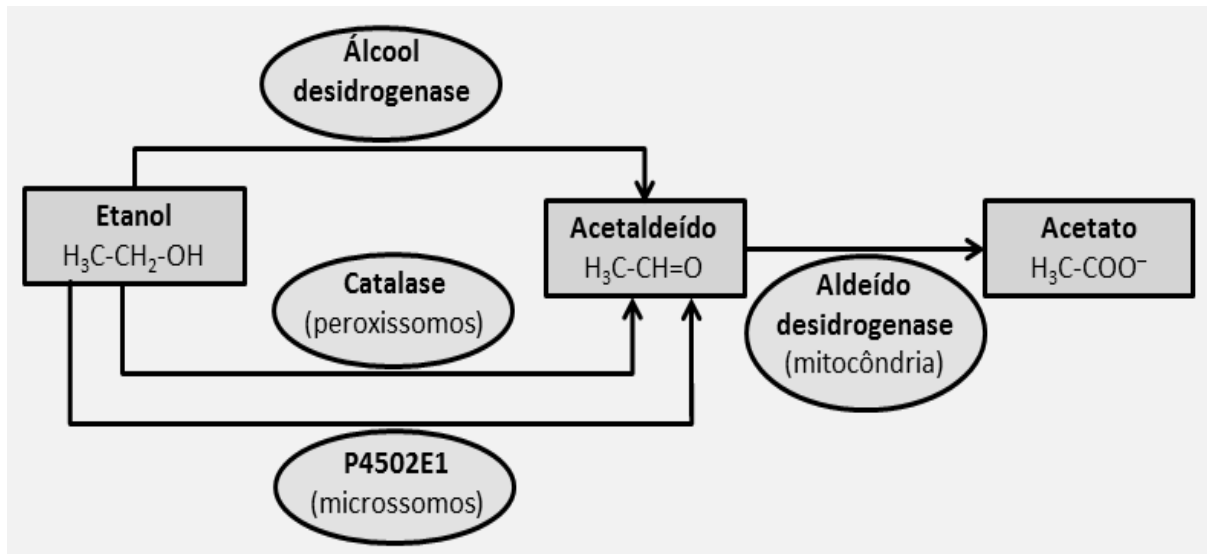


Ilustração 1. Vias de metabolismo do etanol. O álcool é metabolizado por três vias. A mais comum delas envolve as enzimas álcool desidrogenase (ADH) e aldeído desidrogenase (ALDH). Estas enzimas ajudam a quebrar a molécula de álcool, tornando-se possível eliminá-lo do organismo. Em primeiro lugar, ADH metaboliza o álcool em acetaldeído, uma substância altamente tóxica. Em seguida, o acetaldeído é metabolizado a acetato. As enzimas do citocromo microssomal P450 2E1 (CYP2E1) e catalase também são capazes de converter o álcool em acetaldeído. No entanto, CYP2E1 é ativada apenas após ingestão de grandes quantidades de álcool, e catalase metaboliza apenas uma pequena fração do álcool no corpo. Fonte: CISA - Centro de Informações sobre Saúde e Álcool (disponível em: <http://www.cisa.org.br/artigo/5536/metabolismo-alcool.php>).

Muitos dos efeitos metabólicos e tóxicos do álcool nos órgãos têm sido relacionados com o seu metabolismo oxidativo a acetaldeído, que gera um desequilíbrio no status redox local. Este estresse oxidativo pode ser uma característica central associada à lesão tecidual, causada pelo metabolismo do etanol. Entre os sistemas de órgãos, os pulmões de mamíferos são um potencial alvo do estresse oxidativo resultante do abuso crônico de álcool, pois além de metabolizá-lo, pode também sofrer por exposição direta a poluentes ambientais tóxicos, fumaça, e outras partículas presentes no ar (KAPHALIA; CALHOUN, 2013).

Há muitos séculos, médicos têm observado que o consumo excessivo de álcool pode levar não apenas ao dano hepático, mas também está associado com aumento de morbidade e mortalidade por doenças infecciosas. O primeiro cirurgião geral dos Estados Unidos, Benjamin Rush, publicou um artigo intitulado “*An Inquiry Into the Effects of Ardent Spirits Upon the Human Body and Mind*”, em 1785, em que ele relatou que pacientes que

abusavam de álcool eram vulneráveis a febre amarela, tuberculose, pneumonia e abscessos (LIEBER, 2005; MOLINA et al., 2010).

Apesar de afetar vários sistemas, incluindo sistema digestório, nervoso, cardiovascular e imunológico, as mudanças mais importantes decorrentes da exposição ao etanol são devido à exposição crônica, tais como doenças alcoólicas hepáticas (DALs) e aumento da morbidade por doenças infecciosas, como as pneumonias, tuberculose (TBC), infecções pelo vírus sincicial respiratório (VSR) e síndrome da dificuldade respiratória aguda (SDRA) e doença crônica obstrutiva pulmonar (DPOC). O aumento do número de células inflamatórias no fígado em pacientes com DALs sugere que as complicações estão relacionadas também com o sistema imune do indivíduo, já que a maioria das funções das células de Kupffer, os macrófagos residentes do fígado, é desregulada nesses indivíduos (MESSINGHAM; FAUNCE; KOVACS, 2002; SIMET; SISSON, 2015).

Em relação às infecções pulmonares, o abuso de álcool torna-se um grande problema quando o paciente se encontra hospitalizado por outra comorbidade. Alcoolistas hospitalizados estão mais predispostos a desenvolver doenças graves, bem como mais susceptíveis a complicações clínicas e mortalidade, em comparação aos não alcoolistas. Por exemplo, a incidência de tuberculose em pacientes que abusam de etanol é de 15 a 200 vezes maior do que na população não alcoolista (MEHTA, 2016).

Dentre as diversas complicações geradas pelo alcoolismo, a modulação da regulação imunológica pode ser, de alguma forma, prejudicial a resposta imune do hospedeiro durante uma infecção. Um estudo recente desenvolvido por Luong e colaboradores (2015) demonstrou que o álcool tem efeitos negativos no sistema imunológico do hospedeiro, tornando esse hospedeiro mais vulnerável a infecções causadas por *Streptococcus pneumoniae*. Eles observaram que houve uma diminuição da atividade de neutrófilos e secreção de citocinas pró-inflamatórias, que alteraram o curso normal da resposta do hospedeiro à infecção e potencializou a colonização pela bactéria (LUONG et al., 2015).

O álcool também pode causar disfunção dos macrófagos alveolares, que são a primeira linha de defesa celular contra patógenos nas vias aéreas. Macrófagos alveolares comprometidos podem reduzir a produção de citocinas e quimiocinas inflamatórias em resposta à infecção pulmonar, resultando em uma elevada carga bacteriana e aumento da mortalidade (COOK, 1998). Além disso, outros estudos têm demonstrado o efeito do álcool na alteração do fenótipo de macrófagos alveolares. Ohama e colaboradores (2014) retrataram que em camundongos expostos cronicamente ao etanol há uma predominância de macrófagos alternativamente ativados - perfil M2 -, que são caracterizados pela produção de IL-10 e pela expressão de outras moléculas que impedem que o macrófago residente se

converta em macrófago classicamente ativado (M1). Quando esses animais consumistas de álcool são infectados por *Klebsiella pneumoniae*, eles apresentam maior letalidade associada a uma maior carga bacteriana (OHAMA et al., 2014). Já o trabalho realizado por Meyerholz e colaboradores (2008), demonstrou o efeito do consumo de etanol na resposta imune adaptativa mediada por linfócitos em um modelo de infecção pelo vírus influenza. Os camundongos que consumiram álcool cronicamente, não conseguiram montar uma resposta específica mediada por células T CD8⁺ após infecção pelo vírus (MEYERHOLZ et al., 2008).

Devido à influência do etanol nas células do sistema imune, não é surpreendente que a exposição ao etanol também tenha efeitos dramáticos na produção de citocinas, que são proteínas essenciais para orquestrar o processo inflamatório. De modo geral, os estudos sugerem que pode haver uma alteração no equilíbrio de citocinas produzidas por indivíduos consumistas de álcool, alterando a ativação, a instalação, a manutenção e a resolução das respostas inflamatórias e imunes no indivíduo alcoolista (COOK, 1998). Um aumento global de citocinas pró-inflamatórias derivadas de macrófagos, tais como IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- α têm sido relatados no soro de pacientes com DAL. Além disso, na ausência de DAL, a influência de etanol sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias nos indivíduos é menor (MANZO-AVALOS; SAAVEDRA-MOLINA, 2010).

Um modelo de exposição aguda ao álcool de El-Guindy e colaboradores (2007), seguido de um estímulo com LPS, mostrou que o etanol reduziu significativamente a produção dos mediadores pró-inflamatórios (IL-1 β e IL-6) e aumentou a produção basal de IL-10, uma citocina conhecida como anti-inflamatória, sugerindo que a intoxicação com etanol diminui a resposta inflamatória aguda pela diminuição da produção de mediadores pró-inflamatórios importantes (EL-GUINDY; VILLIERS; DOHERTY, 2007). Outro estudo também demonstrou que o tratamento agudo com etanol afeta negativamente a resposta imune inata do hospedeiro. Camundongos expostos ao álcool e submetidos à infecção intraperitoneal (i.p.), por uma linhagem não patogênica de *Escherichia coli*, tiveram dificuldades em combater a infecção, devido à baixa produção da maioria das citocinas pró-inflamatórias que foram suprimidas. Esta deficiência culminou em um menor *clearance* bacteriano, mesmo sendo uma linhagem não patogênica, e também aumentou a letalidade do hospedeiro (BHATTY et al., 2011).

O etanol, por modular a expressão de mediadores inflamatórios e a atividade de populações de células, pode afetar o curso normal de uma resposta inflamatória, interferindo na frequência, sobrevivência e função da maior parte destas células, com consequências graves para a imunidade do indivíduo. No entanto, o mecanismo exato pelo qual o etanol exerce os seus efeitos moduladores nas células e nos mediadores da inflamação ainda não

é completamente compreendido. Assim, torna-se importante o desenvolvimento de estudos para melhor compreensão dos efeitos do consumo de etanol na regulação da resposta imune e inflamatória do hospedeiro (EL-GUINDY; VILLIERS; DOHERTY, 2007; SZABO et al., 2015).

1.2 Respostas imune e inflamatória frente ao *Aspergillus fumigatus*

1.2.1 O microrganismo *Aspergillus fumigatus*

O gênero *Aspergillus* compreende um grupo de fungos ubíquos e saprofíticos que desempenham um importante papel na reciclagem ambiental de carbono e nitrogênio. Seu nicho ecológico principal é o solo ou vegetação em decomposição, porém, o *Aspergillus* produz pequenos conídios que se dispersam facilmente no ar, podendo sobreviver em uma ampla gama de condições ambientais. O gênero *Aspergillus* inclui cerca de 200 espécies, sendo algumas consideradas importantes patógenos em humanos. As doenças fúngicas podem ir desde infecções superficiais de pele até infecções invasivas a órgãos internos, sendo as infecções superficiais mais comuns e mais fáceis de curar. Já as invasivas são menos frequentes, porém oferecem risco de vida. Dentre as espécies patogênicas desse gênero, o *Aspergillus fumigatus* é o agente etiológico de cerca de 90% das infecções diagnosticadas (DAGENAIS; KELLER, 2009; LATGÉ, 1999).

As colônias de *A. fumigatus* possuem coloração verde-acinzentada, forma granular e rápido crescimento. Sua micromorfologia apresenta hifas hialinas e septadas com paredes paralelas. A partir da superfície das hifas, surgem os conidióforos, estruturas simples, em forma de cálice e sem ramificação, que termina em uma vesícula onde ficam inseridas as fiálides uniseriadas, recobrimdo dois terços superiores de sua superfície (Ilustração 2). Além disso, *A. fumigatus* é um fungo termo tolerante, capaz de apresentar crescimento em uma faixa de temperatura de 12°C e 52°C e sobreviver a temperaturas de até 70°C (DAGENAIS; KELLER, 2009; PEREZ-NADALES et al., 2014).



Ilustração 2. Morfologia dos conidióforos e conídios de *A. fumigatus*. Morfologia microscópica de vários conidióforos, onde se observa as fiálides uniseriadas com a produção de conídios (setas vermelhas) durante o crescimento em temperatura de 37°C. Fonte: <http://www.aspergillus.org.uk/content/aspergillus-fumigatus-42?width=600px&height=600px&inline=true#colorbox-inline-1 624441967>

A. fumigatus é considerado uma das espécies mais comuns que habita a microbiota fúngica transportada pelo ar (TEKAIA; LATGÉ, 2005). Possui uma alta capacidade de esporulação, já que cada conidióforo produz milhares de conídios. Os conídios liberados na atmosfera são de diâmetro suficientemente pequeno, cerca de 2 a 5 μm de diâmetro. Não há um mecanismo elaborado para liberação de conídios, a disseminação se dá simplesmente por perturbações do ambiente e forte corrente de ar. Uma vez que os conídios estão no ar, o seu pequeno tamanho os torna flutuantes e tende a mantê-los no ar, tanto em ambientes internos quanto em espaços abertos. Estudos ambientais indicam que todos os seres humanos inalam, pelo menos, centenas de conídios de *A. fumigatus* por dia (DAGENAIS; KELLER, 2009; PEREZ-NADALES et al., 2014). Considerando a sua capacidade em sobreviver em uma vasta gama de condições ambientais e dispersão eficaz no ar, e por possuir características físicas que permitem que os conídios atinjam as vias respiratórias distais, e consequente adaptação rápida no meio ambiente hospedeiro, o *A. fumigatus* é um importante patógeno pulmonar (KWON-CHUNG; SUGUI, 2013).

Não existe uma única característica que determina a patogenicidade de *A. fumigatus*. A sua capacidade de se adaptar a altas temperaturas, ao estresse oxidativo, a limitações de nutrientes, condições de hipóxia, bem como a sua capacidade de sintetizar metabólitos secundários e secretar enzimas para a absorção de nutrientes, contribuem para a sobrevivência de *A. fumigatus* no interior do corpo humano (DAGENAIS; KELLER, 2009; LATGÉ, 2001).

A aspergilose pulmonar é uma infecção de prognóstico reservado, que ocorre principalmente em indivíduos imunodeprimidos e é dispersa em todas as regiões geográficas. As taxas de mortalidade variam de 50% a 95% em populações de alto risco e são dependentes de fatores como o estado imunológico do hospedeiro, o local da infecção, e o regime de tratamento aplicado (BALLOY; CHIGNARD, 2009; MARGALIT; KAVANAGH, 2015). São conhecidas três formas da doença: a aspergilose saprofítica, caracterizada pela colonização das vias aéreas ou pela formação da bola fúngica (também chamada aspergiloma); a aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA), na qual há a indução de uma resposta imune desencadeada pela secreção de toxinas e alérgenos pelo fungo em desenvolvimento. E a terceira forma é a aspergilose pulmonar invasiva, que tem como características a proliferação e crescimento das hifas invasivas dentro do tecido pulmonar (MARGALIT; KAVANAGH, 2015).

Ao longo das últimas décadas, tem havido uma expansão considerável na pesquisa de drogas antifúngicas e no desenvolvimento de compostos e estratégias dirigidas contra aspergilose. Atualmente os compostos aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA), disponíveis para o tratamento de AI, incluem: Anfotericina B, itraconazol, voriconazol, posaconazol e caspofungina. Embora estas drogas antifúngicas sejam eficientes, elas podem desencadear graves efeitos secundários, como nefrotoxicidade e hepatotoxicidade, considerados fatores limitantes para o tratamento (WALSH et al., 2008).

1.2.2 Patogênese e aspectos imunológicos da aspergilose

A infecção por *A. fumigatus* se inicia após a inalação de conídios presentes no ar, seguida pela deposição nos bronquíolos ou nos alvéolos pulmonares. Nos indivíduos imunocompetentes, as barreiras físicas e a imunidade inata são de grande importância para a defesa do hospedeiro. As células epiteliais do trato respiratório superior contribuem para a eliminação de microrganismos e partículas exógenas, a partir da secreção de muco e pelo transporte ativo mediado por cílios. Nos alvéolos, os pneumócitos são responsáveis pela secreção do surfactante pulmonar, com atividade antimicrobiana. No entanto, em pacientes

imunocomprometidos os conídios podem escapar dessas defesas (BRUNE et al., 2015; PEREZ-NADALES et al., 2014).

Após deposição nos espaços alveolares, os conídios, que até então estavam em estado de repouso, se entumescem e tornam-se metabolicamente ativos. Concomitantemente, há a perda da camada *rodlet*, uma camada de hidrofobinas que recobrem a parede celular fúngica. Nesse contexto, há a exposição de componentes pertencentes à parede celular do fungo, o que culmina no desencadeamento da resposta imune pró-inflamatória no hospedeiro (DAGENAIS; KELLER, 2009; ERWIG; GOW, 2016; MARGALIT; KAVANAGH, 2015; PEREZ-NADALES et al., 2014).

O desencadeamento da resposta imune está relacionado com o reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) do fungo, por intermédio de receptores de reconhecimento de padrão (PRRs), presentes nos macrófagos alveolares e células epiteliais do hospedeiro. Os receptores do tipo Toll 2 (TLR2) e 4 (TLR4) e o receptor de lectina do tipo C (CLR), dectina-1, são os mais bem caracterizados PRRs envolvidos no reconhecimento de *A. fumigatus* e na ativação das células do hospedeiro. Os conídios e as hifas são capazes de ativar macrófagos pelos receptores TLR2 e TLR4, enquanto dectina-1 é específica para os carboidratos fúngicos $\beta(1,3)$ -glucana, que estão normalmente mascarados na parede celular dos conídios de *A. fumigatus*. Com a perda da camada *rodlet*, há a germinação dos conídios (tubos germinativos) e a $\beta(1,3)$ -glucana torna-se exposta e é então reconhecida por dectina-1. Os sinais de dectina-1 ativam a via do fator nuclear κ B (NF- κ B) e induz a expressão de citocinas e quimiocinas, que são importantes para a defesa do hospedeiro contra este organismo e também para o recrutamento de neutrófilos, incluindo o fator de necrose tumoral alfa (TNF), interleucina (IL) -8, IL-6, IL-1 α , IL-1 β , fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF), fator estimulador de colônias granulócitos e macrófagos (GM-CSF), proteína inflamatória de macrófagos (MIP) -1 α e a MIP-1 β , os ligantes de CXCR2, as quimiocinas CXCL1/KC e CXCL2/MIP-2 e a citocina anti-inflamatória IL-10, indicando que há também um controle da resposta inflamatória (CHAI et al., 2011; ERWIG; GOW, 2016; MARGALIT; KAVANAGH, 2015; VALIANTE et al., 2015).

Os neutrófilos, granulócitos que são rapidamente recrutados para os alvéolos, têm a capacidade de fagocitar tanto conídios quanto tubos germinativos. Além disso, os neutrófilos são considerados as principais células de defesa contra as hifas, devido a sua capacidade em produzir espécies reativas de oxigênio (ROS), liberação de conteúdo granular e formação de armadilhas extracelulares dos neutrófilos (NETs). Desta forma, um dos pontos substanciais desta infecção fúngica, é que indivíduos neutropênicos, devido a tratamentos imunossupressores em casos de câncer e transplante de órgãos, estão especialmente mais

propensos a infecções provocadas por diferentes patógenos, como *A. fumigatus* (LATGÉ, 2001; MARGALIT; KAVANAGH, 2015; PEREZ-NADALES et al., 2014).

Conforme mencionado anteriormente, o papel decisivo de eliminação desse patógeno cabe aos macrófagos alveolares, aos neutrófilos e a atividade antimicrobiana relacionada a essas células, bem como fatores relacionados à imunidade humoral, como, por exemplo, complemento. Um estudo feito com camundongos que tiveram seus macrófagos alveolares depletados, mostrou que os animais não foram capazes de controlar a carga fúngica, mesmo com um número elevado de neutrófilos recrutados. Da mesma forma, camundongos que sofreram depleção de neutrófilos, se mostraram altamente susceptíveis a infecção por *A. fumigatus*, indicando que há um papel colaborativo entre esses dois tipos celulares para eliminação dos conídios do fungo. Portanto, essas células são essenciais nos estágios iniciais da infecção por *A. fumigatus* e desempenham importantes funções nos mecanismos de resistência do hospedeiro, contribuindo para o estabelecimento de uma resposta imune efetiva contra o fungo (DAGENAIS; KELLER, 2009; ERWIG; GOW, 2016; MARGALIT; KAVANAGH, 2015).

Os fungos detectados pelas células da imunidade inata levam à produção de citocinas, recrutamento de diferentes células do sistema imune inato e, podem também, desencadear respostas imunes adaptativas. A exposição aos conídios de *A. fumigatus* leva ao desenvolvimento de diversas respostas por linfócitos T CD4+, que incluem células T auxiliares (Th1, Th2 e Th17). Vários fatores contribuem para a diferenciação de linfócitos T CD4+ por *A. fumigatus*, incluindo a frequência de exposição e o tipo de antígeno. Estudos demonstraram que camundongos desafiados repetidamente com conídios de *A. fumigatus* apresentaram um predomínio de IgE, eosinófilos e IL-4, que são característicos de Th2, o que contribui para o desenvolvimento de aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA). Uma resposta Th2 exagerada está associada em uma reação inflamatória prejudicial como a eosinofilia, aumento da produção do muco e troca de classe de imunoglobulina para IgE. Exposições repetidas em modelo murino de infecção por *A. fumigatus* também podem resultar em um aumento no recrutamento de células Th17. Estudos indicam que uma resposta Th17 pode estar diretamente envolvida em uma doença fúngica alérgica. Murdock e colaboradores (2012) demonstraram que camundongos knockout para IL-17, desafiados repetidamente com conídios de *A. fumigatus*, apresentaram uma atenuação da inflamação e redução significativa de eosinófilos. Por outro lado, em modelos de exposição única, a resposta específica para *A. fumigatus* consiste em uma resposta predominantemente Th1. O papel protetor da resposta Th1 durante infecção por *A. fumigatus* foi demonstrado, tanto em pacientes imunocomprometidos, quanto em camundongos neutropênicos, devido sua

capacidade de neutralizar citocinas induzidas por uma resposta Th2 (SMITH; KAUFFMAN, 2012; THAKUR et al., 2015a; ZHU; YAMANE; PAUL, 2010).

O aumento da incidência de doenças fúngicas ao longo das últimas décadas tem reforçado o interesse em compreender os mecanismos pelos quais a doença é prevenida em indivíduos normais e métodos para a modulação imunológica que podem proteger os indivíduos susceptíveis (HOHL; FELDMESSER, 2007).

1.3 Importância dos neutrófilos na inflamação

Os neutrófilos representam a primeira linha de defesa do organismo contra patógenos e são componentes essenciais das respostas inflamatórias agudas, participando ativamente da resolução da infecção microbiana (COX, 1998). Em resposta à entrada de um microrganismo invasor ou a dano tecidual, nos locais de infecção, os macrófagos que entraram em contato com microrganismos produzem citocinas, que ativam as células endoteliais de vênulas adjacentes a produzir selectinas, ligantes de integrinas e outros mediadores quimiotáticos, como o fragmento C5a do complemento; o mediador lipídico eicosanóide leucotrieno B4 (LTB4); o mediador fosfolipídico fator de agregação plaquetária (PAF); as quimiocinas CXCL1/KC, CXCL-2/MIP-2 e IL-8; e as citocinas TNF- α e da família IL-1. Esses mediadores quimiotáticos produzidos são apresentados na superfície endotelial e interagem com receptores presentes nos leucócitos em processo de rolamento, resultando na ativação das integrinas leucocitárias e a um estado de ligação de alta afinidade entre os leucócitos e o endotélio vascular. As integrinas, como β 1 e β 2 ativadas ligam-se às moléculas de adesão I e V - ICAMs e VCAMs, expressas nas células endoteliais, mediando a adesão firme dos leucócitos. Em seguida, os leucócitos rastejam pelas junções entre as células endoteliais e transmigram através da parede venular (Ilustração 3). Assim, os neutrófilos tornam-se capazes de responder eficientemente aos estímulos provenientes do sítio de infecção ou lesão no tecido (LEE et al., 2015; MEDEIROS et al., 2008; SOUZA et al., 2000; ZEMANS; COLGAN; DOWNEY, 2009).

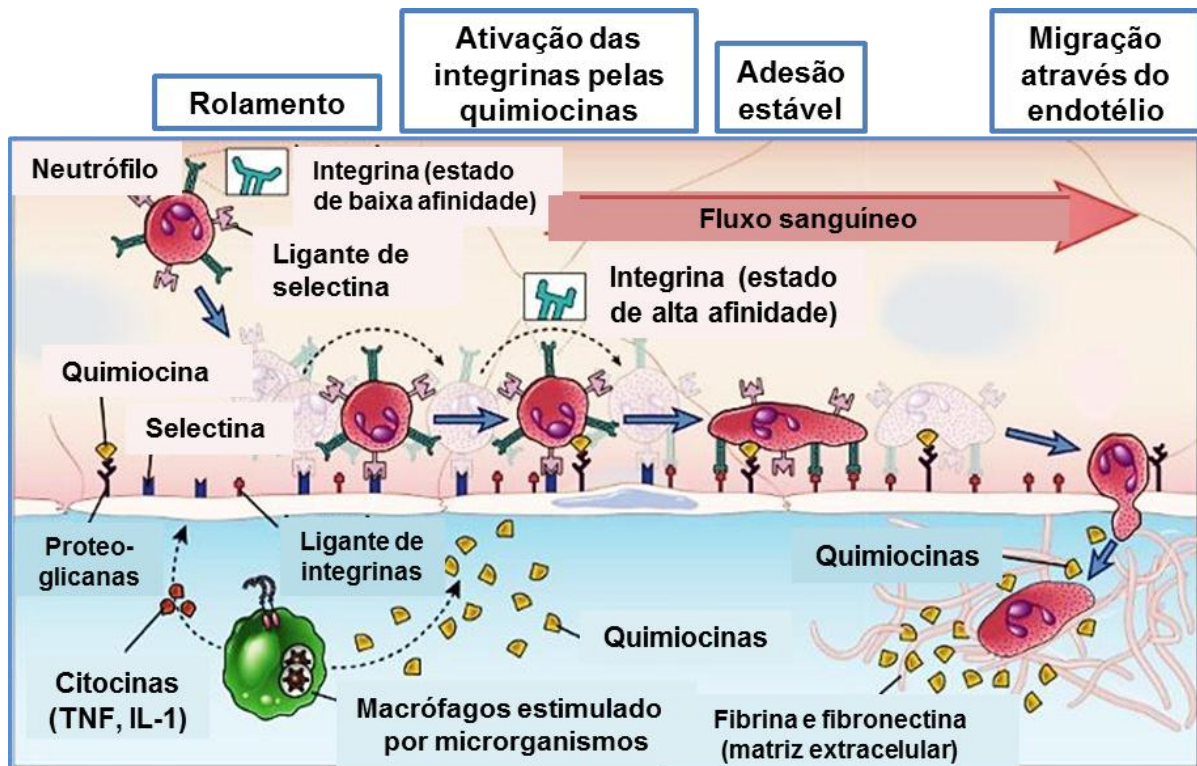


Ilustração 3. Migração de neutrófilos para o tecido. O processo de migração de neutrófilos requer interações entre esses leucócitos e as células endoteliais por múltiplas etapas. Macrófagos estimulados induzem a produção de citocinas que ativam as células endoteliais a produzir selectinas, ligantes de integrinas e quimiocinas. As quimiocinas são apresentadas na superfície endotelial e, após a ligação com seus receptores presentes nos neutrófilos, induzem a ativação das integrinas a um estado de ligação de alta afinidade e mediando a adesão firme de leucócitos. Em seguida, há a migração do leucócito através da parede da vênula. Fonte: <https://studentconsult.inkling.com/read/cellular-and-molecular-immunology-abbas-7th/chapter-3/chapter-3-presentation-slides#2>

A importância da migração dos neutrófilos é bem estabelecida em modelos experimentais de sepse, tanto polimicrobiana quanto induzida por inoculação com *Candida albicans*. A sepse é uma resposta sistêmica grave a uma infecção, cuja presença de neutrófilos no sítio infeccioso é essencial para o controle da carga bacteriana ou fúngica. Nesse contexto, camundongos que sofreram depleção de neutrófilos e foram posteriormente infectados com *C. albicans* tiveram uma maior disseminação do fungo, gerando uma resposta inflamatória sistêmica, seguida pela morte do hospedeiro (SÔNEGO et al., 2016).

Nos quadros de sepse, o que se observa é que a migração de neutrófilos para o foco infeccioso é falha, apesar da produção de altos níveis de quimiocinas no sítio da infecção.

Dentre os mecanismos que podem levar ao número insuficiente de neutrófilos no sítio da infecção, o que tem sido mostrado por Alves-Filho e colaboradores (2009), é que o receptor de quimiocinas CXCR2 é internalizado nos neutrófilos circulantes de camundongos e de pacientes com sepse severa (ALVES-FILHO et al., 2009).

No sítio de infecção, os neutrófilos podem atuar na eliminação de micro-organismos invasores por meio de uma série de mecanismos. O principal deles é a fagocitose do patógeno, o qual fica confinado no fagossomo que, em seguida, se funde com os grânulos intracelulares dos neutrófilos, formando, então, o fagolisossomo. No fagolisossomo os patógenos são eliminados pela ação de enzimas, peptídeos antimicrobianos e espécies reativas de oxigênio (ROS). Tais produtos têm efeitos extremamente danosos, tanto para os patógenos, como para o próprio organismo invadido, pois apresentam alta reatividade e baixa especificidade, sendo capazes de interagir com um número praticamente ilimitado de moléculas. Os neutrófilos apresentam grânulos bastante heterogêneos no que se refere ao conteúdo e à função. São quatro os tipos de grânulos dos neutrófilos: os azurófilos, os específicos, os de gelatinase e os secretórios. Os grânulos azurófilos são ricos em α -defensinas, as quais são potentes peptídeos antimicrobianos, e na enzima mieloperoxidase, que utiliza peróxido de hidrogênio e haletos, como cloretos e brometos, para produzir ácido hipocloroso e ácido hipobromoso, os quais são potentes agentes antimicrobianos. Os grânulos específicos e de gelatinase contêm lactoferrina, lipocalina, LL-37 e as metaloproteinasas da matriz extracelular (MMPs), as quais são capazes de degradar os mais variados tipos de moléculas da matriz extracelular. Finalmente, as vesículas secretórias apresentam integrinas, receptores de citocinas e quimiocinas, receptor do complemento CR1, receptores da porção Fc de imunoglobulinas, receptores de morte, dentre outros. As vesículas secretórias são as primeiras a serem liberadas, uma vez que contêm um reservatório de receptores, que são necessários para as fases iniciais da resposta inflamatória mediada por neutrófilos (ADROVER; NICOLÁS-ÁVILA; HIDALGO, 2016; KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013; MARGALIT; KAVANAGH, 2015).

Após a fagocitose do micro-organismo, o conteúdo dos grânulos dos neutrófilos é fornecido ao fagossomo, de forma que peptídeos microbianos e enzimas podem atuar diretamente sobre o parasita, promovendo a eliminação do mesmo. No entanto, quando os neutrófilos não conseguem englobar os micro-organismos invasores, eles liberam o conteúdo de seus grânulos para o meio extracelular. Outro mecanismo utilizado por neutrófilos para a eliminação de micróbios é a formação de NETs (Neutrophil Extracellular Traps), que são verdadeiras armadilhas produzidas por neutrófilos no espaço extracelular. NETs são formadas por um arcabouço de cromatina, ao qual se encontram associados peptídeos e enzimas, que normalmente se localizam nos grânulos dos neutrófilos. Assim,

NETs representam um mecanismo eficiente que evita a disseminação do patógeno e favorece a concentração local de diversos agentes antimicrobianos, que atuam na degradação de fatores de virulência e até mesmo na eliminação do micróbio invasor (KLEBANOFF, 2005; KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013; ROTH FLACH; CZECH, 2015).

Além da produção de mediadores pelos macrófagos residentes dos tecidos infectados, os linfócitos T helper (Th) 17 e a resposta pró-inflamatória Th17 tem grande importância na manutenção da resposta inflamatória neutrofílica (KOYASU; MORO, 2012). As células Th17, caracterizadas pela produção de IL-17, são diferenciadas na presença de TGF- β e IL-6, com a participação do fator de transcrição ROR γ t. Os linfócitos Th17 estimulam as células epiteliais, endoteliais e macrófagos a produzirem citocinas e quimiocinas inflamatórias (tais como CXCL8, IL-1 β , IL-23 e IL-6) e peptídeos antimicrobianos, induzindo tanto o acúmulo quanto a maior sobrevivência de neutrófilos, desempenhando um importante papel no controle das infecções fúngicas (KOYASU; MORO, 2012; THAKUR et al., 2015b; ZHU; YAMANE; PAUL, 2010).

Após toda a destruição causada durante o processo inflamatório, os neutrófilos participam também do processo de regeneração tecidual. Para tal, os neutrófilos começam a gerar sinais com quatro propósitos principais: retardar seu próprio acúmulo no tecido inflamado; suprimir suas próprias atividades; promover sua própria morte; e atrair e ativar macrófagos a cessar o dano ao tecido e iniciar a orquestração do reparo tecidual (JIE et al., 2016).

De um modo geral, observa-se que controle da invasão fúngica por *A. fumigatus* é realizado pela integridade da pele e mucosas, pelo reconhecimento e fagocitose de macrófagos, pela resposta imune celular mediada pelas células T CD4+ e principalmente pela atividade normal de neutrófilos (CURBELO; GALVÁN; ASPA, 2014). Nesse contexto, é crucial para a defesa do hospedeiro que haja a migração, reconhecimento, *killing*, e resolução da resposta inflamatória infecciosa mediada por neutrófilos.

2 JUSTIFICATIVA

O alcoolismo é uma doença grave, que afeta e causa morte em grande parte da população mundial. É ainda um grande problema quando esses pacientes são hospitalizados, já que o efeito do consumo de etanol é bastante prejudicial ao sistema imunológico, devido à toxicidade dos produtos do metabolismo do etanol nos pulmões, que podem induzir lesão tecidual e consequente comprometimento da resposta imune nesse órgão. O consumo de etanol também tem sido associado com uma maior susceptibilidade a infecções. Dentre as principais doenças infecciosas que acometem os alcoolistas, encontram-se as pneumonias, que podem ser ocasionadas por diferentes patógenos pulmonares, dentre eles o *A. fumigatus*. A incidência de infecções pulmonares graves causadas pelo fungo *A. fumigatus* tem aumentado nas três últimas décadas, principalmente devido ao aumento do número de doentes imunodeprimidos, representando uma séria causa de morbidade e mortalidade nesta população. Considerando que as interações patógeno-hospedeiro que regem a instalação e desenvolvimento de infecções fúngicas nestes pacientes são pouco exploradas e caracterizadas, torna-se importante entender como acontece a interação entre o hospedeiro alcoolista e o patógeno fúngico. Além disto, as elucidações dos mecanismos envolvidos nestas interações podem contribuir para futuras intervenções terapêuticas no controle do processo inflamatório em um hospedeiro alcoólatra.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

Investigar o efeito do consumo crônico de etanol na instalação e manutenção de respostas imune e inflamatória do hospedeiro durante a infecção pulmonar pelo fungo *Aspergillus fumigatus*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais experimentais

O projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG (CEUA/UFMG), sob o número do protocolo 4/2015 (ANEXO I). Foram utilizados camundongos livres de patógenos específicos (SPF, do inglês, *specific pathogen free*), isogênicos, machos, da linhagem C57BL/6J com 20-25 gramas de peso e 5-6 semanas de idade, obtidos no Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os camundongos foram agrupados em cinco animais por gaiola e mantidos em condições de temperatura e luz controladas, no biotério do Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG. A disponibilidade de ração e água ou de ração e solução alcoólica foi acompanhada diariamente.

4.2 Modelo de alcoolismo

O modelo murino do consumo crônico de etanol (EtOH) foi seguido de acordo com uma padronização realizada por Yeligar e colaboradores (2012). Esse modelo reproduz os níveis de álcool no sangue após o consumo crônico de álcool em indivíduos humanos (YELIGAR et al., 2012). O álcool etílico (Vetec) foi disponibilizado exclusivamente para os animais em uma solução aquosa contendo EtOH, durante 12 semanas. Inicialmente, os camundongos passaram por um período de aclimação e adaptação a ingestão de EtOH sendo disponibilizada exclusivamente a solução de etanol a 5% (v/v), na segunda semana a 10% (v/v) e, nas 10 semanas seguintes, os camundongos receberam 20% (v/v) da solução de EtOH. Durante o tratamento, a quantidade de EtOH ingerido e o peso dos animais foram quantificados e após o consumo crônico de álcool, os níveis da enzima alanina amino transferase (ALT) foi medido por *kit* específico (Bioclin).

4.3 Dosagem de etanol no sangue

Os animais foram anestesiados com uretana (1,25 g/Kg, i.p., Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e 1 mL de sangue foi coletado via veia cava inferior utilizando seringas heparinizadas. Após isso, 100 µL das amostras foram transferidas para tubos *headspace* de 20 mL, contendo 500 µL de solução aquosa de (NH₄)₂SO₄ a 10%, o Isobutanol (100 mg/dL) foi utilizado como padrão interno. Os frascos foram devidamente lacrados e colocados em suporte do amostrador automático, operando no modo *headspace* e incubados sob agitação

a 400 rpm por 15 minutos a 80°C. A análise da concentração de etanol das amostras procedeu-se no cromatógrafo gasoso Varian CP3380 (Varian, CA, USA), equipado com detector de ionização de chama e coluna capilar de sílica fundida Carbowax (30 m × 0,25 mm I.D., espessura 0,25 µm) (Chrompack, São Paulo, SP, Brasil). O modo de injeção foi realizado sem divisão de amostra por 30 segundos. A temperatura da coluna foi ajustada para 40°C por 4 min a 220°C (2 min) (15 °C/min). A temperatura do injetor e detector foi ajustada para 220 e 300°C, respectivamente. Os resultados foram expressos em mg de etanol/dL de sangue (GONZAGA et al., 2015).

4.4 Cultivo, preparo do inóculo e infecção via intranasal de *A. fumigatus*

Neste trabalho utilizou-se a linhagem CEA-17 de *A. fumigatus* proveniente de um isolado clínico. Os conídios de *A. fumigatus* foram plaqueados em cultura por após 48 horas de crescimento a 37°C em meio YAG completo, composto de 2% p/v de glicose, 2% p/v de ágar, 0,5% p/v de extrato de levedura e elementos de traço (SORIANI et al., 2008) Após, foram coletados por lavagem com 30 mL de solução salina tamponada (PBS 1X), estéril, e filtrados através de uma membrana de *nylon* estéril de 40 µm, para remover fragmentos de hifas. As amostras foram centrifugadas a 2000 rpm por 10 minutos a 23°C (Centrífuga 320R, Hettich, Tuttlingen, Alemanha). Após centrifugação, os conídios foram ressuspensos em 1 mL de PBS 1X, estéril, diluídos e contados em câmara de Neubauer. A concentração foi ajustada para 3×10^8 células em 40 µL de suspensão fúngica, antes da inoculação. Foram empregadas, para o inóculo experimental, culturas de *A. fumigatus* que apresentaram, pelo menos, 90% de viabilidade.

O modelo de aspergilose pulmonar foi realizado conforme proposto no trabalho científico 1 (anexo II) de Oliveira-Malacco e colaboradores. Após as 12 semanas de tratamento, os animais controle que consumiram somente água (H₂O), e os animais tratados somente com EtOH, foram anestesiados por vaporização de até 3% de isoflurano (Biochimico, Itatiaia, RJ, Brasil). Aproximadamente 30 segundos após administração do isoflurano, os camundongos foram infectados, via intranasal (i.n.), com *A. fumigatus*. Para isso, o animal foi contido manualmente e, em seguida, foi administrado 40 µL da suspensão fúngica pela narina do animal (3×10^8 conídios/animal). Após a administração do fungo, os animais foram mantidos aquecidos e observados até o término do efeito da anestesia. Como controle negativo, os animais receberam 40 µL de solução PBS 1X estéril pela mesma via.

4.5 Análise da sobrevida e alteração de peso corpóreo de camundongos infectados por *A. fumigatus*

Os camundongos foram inoculados com 3×10^8 conídios viáveis de *A. fumigatus* e a sobrevivência e alteração de peso corpóreo foram acompanhados por um período de 10 dias. A morte dos animais nos diferentes grupos foi registrada diariamente e a curva de sobrevida determinada.

4.6 Determinação de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) nos pulmões de animais infectados com *A. fumigatus*

Para avaliar a capacidade do clearance fúngico dos pulmões dos animais, o pulmão direito foi removido após um e dois dias de infecção. Os animais foram eutanasiados com uma solução de 150 mg/kg de quetamina (Syntec, Cotia, SP, Brasil) e 10 mg/kg de xilazina (Syntec, Cotia, SP, Brasil), via intraperitoneal (i.p.). O pulmão foi macerado e homogeneizado em 1 mL de PBS estéril. Após diluição, alíquotas de 100 μ L dessa suspensão foram semeadas, em duplicata, com auxílio de bastões de vidro, em placas de Petri (J-Prolab), contendo meio de cultura YAG. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa incubadora BOD (TE-371 – Tecnal), sob câmara úmida a 37°C. As unidades formadoras de colônias foram contadas após 20 horas de crescimento e o resultado foi expresso em número de UFC $\times 10^6$ por pulmão direito.

4.7 Análises histopatológicas

Após um e dois dias de eutanásia, os pulmões dos animais foram perfundidos com 5 mL de PBS pelo ventrículo direito do coração, para remoção de sangue do leito vascular pulmonar, e imediatamente removidos. O pulmão esquerdo foi fixado em solução de formalina 4% (formol tamponado em solução salina) e acondicionado até o processamento das amostras. Em seguida, as amostras foram desidratadas em diferentes concentrações de etanol, diafanizadas em xilol e embebidas em blocos de parafina. Com auxílio de um micrótomo, foram obtidos cortes histológicos de 4 mm de secções do pulmão dispostos em lâminas de microscopia. Os cortes foram corados com hematoxilina-eosina (HE), para avaliação do infiltrado inflamatório, ou coloração de metenamina de prata de Grocott (GMS) (EasyPath, São Paulo, SP, Brasil), para avaliação da presença do fungo no tecido pulmonar, onde os conídios são evidenciados pela cor castanho escuro ou preta em um fundo esverdeado, pela contra coloração das células do tecido com verde-luz. As lâminas foram

avaliadas em microscópio Axio Imager (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) adaptado a uma câmera digital (PowerShot A620, Canon, Tóquio, Japão).

4.8 Lavado broncoalveolar (BAL)

O lavado broncoalveolar (BAL) foi realizado para avaliar o perfil de células inflamatórias presentes no sítio infeccioso. Após um e dois dias de eutanásia, a traqueia de cada animal foi exposta e canulada com um cateter de polipropileno (1,7 mm). O lavado foi realizado pela injeção de duas alíquotas de 1,2 mL de PBS 1X estéril gelado, por três vezes cada uma, obtendo-se, aproximadamente, 2 mL de volume final recuperado do lavado. O fluído recolhido do lavado foi centrifugado 2000 rpm por 10 minutos a 4°C, e o sobrenadante resultante foi coletado e armazenado em freezer -20°C para posteriores ensaios de detecção de citocinas e para avaliação da concentração proteica. O sedimento de células foi ressuspenso em 100 µL de solução de PBS 1X para a contagem total e diferencial de leucócitos.

4.9 Contagem total e diferencial das células do BAL

A contagem do número total de leucócitos presentes no BAL foi realizada na diluição de 1:10 empregando solução de Turk (Renylab, Barbacena, MG, Brasil), em câmara de Neubauer e visualização em microscópio óptico. A contagem diferencial das células foi realizada em lâminas preparadas em citocentrífuga (CT-2000, Cientec), a 95 x g por 5 minutos, e submetidas à coloração com *kit* Panótico rápido (Laborclin, Pinhais, PR, Brasil), seguida de visualização em microscópio óptico em objetiva de imersão (100 x). Para cada lâmina examinada, foi contado um total de 200 leucócitos, diferenciados por critérios morfológicos em quatro tipos celulares: neutrófilos, eosinófilos, macrófagos e linfócitos. A quantidade de cada tipo celular foi calculada a partir da porcentagem encontrada em relação ao número total de células. Os valores obtidos foram expressos em número de células por BAL.

4.10 Avaliação da atividade de mieloperoxidase (MPO)

O acúmulo de neutrófilos no tecido pulmonar foi avaliado por meio do ensaio de atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), o que permite indicar indiretamente o infiltrado neutrofílico no sítio de infecção (HUANG et al., 2016). Após um e dois dias de eutanásia dos animais, 100 mg de tecido pulmonar obtidos de animais controle e infectados foram homogeneizados, utilizando-se homogeneizador elétrico de tecidos (Power Gen 125 - Fisher

Scientific Pennsylvania, USA), em 1,9 mL de tampão I (0,1M NaCl, 0,02M NaPO₄, 0,015M NaEDTA, pH 4,7) e centrifugados a 10.000 rpm for 10 minutos a 4°C, descartando-se o sobrenadante. O precipitado foi submetido à lise hipotônica com 1,5 ml de solução NaCl 0,2% durante 30 segundos seguida pela adição de igual volume da solução contendo NaCl 1,6% e glicose 5% e submetido a centrifugação 10.000 rpm for 10 minutos a 4°C. O precipitado foi suspenso em tampão II (0,05M NaPO₄ - pH 5,4, contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio - HTAB) e homogeneizado. As suspensões foram submetidas a três ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido e centrifugadas por 15 minutos a 10.000 rpm a 4°C, coletando-se o sobrenadante para o ensaio. O ensaio de MPO foi conduzido adicionando 25 µL da amostra, na diluição 1:3, em duplicata, em microplaca de 96 poços (o tampão II – 25 µL/poço corresponde ao branco). A reação foi iniciada pela adição de 25 µL do substrato 3,3'-5,5'-tetrametilbenzidina (TMB, Sigma) dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO, Merck, Darmstadt, Alemanha) com concentração final de 1,6 mM e incubação a 37°C por 5 minutos. Após, adicionou-se 100 µL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) diluído numa concentração final de 0,002% (v/v) em tampão II e incubou-se a 37°C por 5 minutos. Acrescentou-se 100 µL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 1 M para término da reação. A atividade de MPO foi avaliada pela medida das alterações na densidade óptica (D.O.) em espectrofotômetro de microplacas (µQuant™, Biotek, Winooski, Vermont, USA) a 450 nm. Os resultados foram expressos em unidades relativas de acordo com uma curva-padrão de neutrófilos purificados (> 95% pureza) da cavidade peritoneal de camundongos estimulados com caseína 5%.

4.11 Avaliação da atividade de N-acetilglicosaminidase (NAG)

O acúmulo de macrófagos no tecido pulmonar foi avaliado pelo ensaio de atividade da enzima NAG, conforme Barcelos e colaboradores (2005). Cem mg de tecido pulmonar obtidos de animais controle e infectados foram homogeneizados em 1,9 mL de tampão I (0,1 M NaCl, 0,02 M NaPO₄, 0,015M NaEDTA, pH 4,7) e centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C, descartando-se o sobrenadante. O precipitado foi submetido a lise hipotônica com 1,5 ml de solução NaCl 0,2% durante 30 segundos seguida pela adição de igual volume da solução contendo NaCl 1,6% e glicose 5%. Após centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C, o precipitado foi suspenso e homogeneizado em solução salina 0,9% com 0,1% v/v de Triton X-100, seguido de centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi coletado para o ensaio. A reação foi realizada pela adição de 100 µL da amostra em microplacas de 96 poços, seguido da adição de 100 µL de p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glicosaminidina (Sigma) diluído em tampão citrato/fosfato (C₆H₈O₇ 0,1 M; Na₂HPO₄ 0,1 M, pH 4,5) e incubação a 37°C por 10 minutos. O término da reação ocorreu pela adição de

100 µL de tampão glicina 0,2 M (pH 10,6). Foi realizada leitura em espectrofotômetro de microplacas com comprimento de onda de 405 nm. O número de macrófagos foi calculado a partir de uma curva-padrão de atividade de NAG expressa a partir de macrófagos obtidos da cavidade peritoneal de camundongos estimulados com tioglicolato 3%. Os resultados foram expressos em número relativo de macrófagos em 100 mg de tecido.

4.12 Avaliação da atividade de peroxidase eosinofílica (EPO)

A avaliação da atividade de EPO por análise colorimétrica é utilizada como uma medida indireta da quantidade de eosinófilos no tecido, conforme descrito por STRATH e colaboradores (1985). Cem mg de tecido pulmonar obtidos de animais controle e infectados foram homogeneizados em PBS 5% e centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C, descartando-se o sobrenadante. O precipitado foi submetido a lise hipotônica com 1,5 mL de solução NaCl 0,2% durante 30 segundos seguida pela adição de igual volume da solução contendo NaCl 1,6% e glicose 5%. Após centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi suspenso e homogeneizado em solução PBS com 0,5% brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB, Sigma). As amostras foram homogeneizadas e submetidas a três ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido e centrifugadas a 10.000 rpm por 15 minutos a 4°C, coletando-se o sobrenadante para o ensaio. A reação foi realizada pela adição de 75 µL do sobrenadante em microplacas de 96 poços, seguido da adição de 75 µL do substrato (1,5 mM de ortofenildiamina - OPD em tampão Tris-HCl 0,075 mM, pH 8,0, acrescido de H₂O₂ 6,6 mM). Após 30 minutos de incubação no escuro, a reação foi interrompida pela adição de 50 µL de H₂SO₄ e realizada leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 492 nm.

4.13 Quantificação de citocinas e quimiocinas por ELISA

As concentrações de citocinas foram quantificadas no soro e BAL um e dois dias após infecção, pelo método imunoenzimático de ELISA sanduíche, utilizando-se kits de anticorpos murinos específicos para cada citocina, seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante (R&D Systems, Minneapolis, USA). Para a realização do ensaio, fragmentos do tecido pulmonar foram homogeneizados em PBS contendo inibidores de proteases (0,1 mM *phenylmethanesulfonyl fluoride* - PMSF, cloreto de benzetônio 0,1 mM, EDTA 10 mM e Aprotinina A 0,01 mg/ml, pH 7,4 e Tween 20 0,05%). Os anticorpos de captura foram diluídos em PBS estéril e adicionados 100 µL/poço em microplacas de 96 poços (C96 MicroWell™ Plates, Nunc, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), na concentração indicada pelo fabricante. Após a sensibilização das placas durante 18 horas a 4°C, as

mesmas foram lavadas três vezes com solução PBS acrescida de 0,05% de Tween 20 (PBS-T) (tampão de lavagem). Após as sucessivas lavagens, foram adicionados 200 µL/poço de tampão fosfato com 1% de BSA (tampão de bloqueio) seguido de incubação à temperatura ambiente por uma hora. Após o bloqueio, os poços foram novamente lavados com tampão de lavagem e adicionados 100 µL das amostras experimentais. Foi preparada a curva-padrão com as citocinas recombinantes de acordo com as instruções do fabricante. As placas foram incubadas a 4°C por 18 horas. Após incubação, as placas foram lavadas e foram adicionados 100 µL/poço dos anticorpos de detecção biotinilados, na concentração indicada pelo fabricante. As placas foram incubadas por duas horas à temperatura ambiente. Após a incubação, foi realizado novo ciclo de lavagem, seguido da adição de 100 µL/poço de solução de streptavidina conjugada com peroxidase (HRP-Streptavidin, Pharmigen - 1:4000) e incubação por 20 minutos à temperatura ambiente. As placas foram submetidas novamente ao ciclo de lavagem e realizada a revelação da reação pela adição de 100 µL/poço de solução de *o-phenylenediamine dihydrochloride* (OPD, Sigma) e incubação por 20 minutos à temperatura ambiente no escuro. A reação foi bloqueada adicionando 50 µL/poço de H₂SO₄ 1M. A D.O. foi avaliada em espectrofotômetro de microplaca com filtro de 492 nm e a concentração calculada a partir da curva padrão. Os resultados foram apresentados como a concentração da citocina em 100 mg de tecido.

4.14 Leucograma

Após as 12 semanas de tratamento com EtOH, os animais foram anestesiados, via i.p., com uma solução de 75 mg/kg de quetamina e 5 mg/kg de xilazina, e 500 µL do sangue foi coletado da veia cava inferior usando seringas heparinizadas. As células totais foram contadas em câmara de Neubauer após diluição de 20 vezes (1:20) em Líquido de Turck e a contagem diferencial foi feita a partir das lâminas de esfregaço sanguíneo coradas com *kit* Panótico rápido, seguida de visualização em microscópio óptico em objetiva de imersão (100 x). Para cada lâmina examinada, foi contado um total de 200 leucócitos, diferenciados por critérios morfológicos em dois tipos celulares: neutrófilos e leucócitos mononucleares (macrófagos e linfócitos). A quantidade de cada tipo celular foi calculada a partir da porcentagem encontrada em relação ao número total de células. Os valores obtidos foram expressos em número de células por mL de sangue.

4.15 Quantificação de proteínas

A quantificação das proteínas totais no BAL foi feita por *kit* específico (Bio-Rad *Protein Assay*), com base no método de Bradford (BRADFORD, 1976) e foi utilizado para

avaliar o extravasamento de proteínas plasmáticas para os alvéolos. A reação foi realizada pela adição de 40 µL do reagente para 160 µL do sobrenadante do BAL em microplacas de 96 poços. A D.O. foi avaliada em espectrofotômetro de microplaca com filtro de 595 nm e a concentração de proteínas das amostras foi avaliada a partir da curva padrão contra a absorbância, com concentrações que foram de 5 a 30 pg/mL. Os resultados são apresentados em mg/mL.

4.16 Microscopia intravital

A interação entre os leucócitos com a microvasculatura na inflamação foi observada por microscopia intravital do cremaster, o músculo que envolve o saco escrotal do camundongo (OLIVEIRA et al., 2013). Após as 12 semanas de tratamento com álcool, a inflamação no cremaster foi induzida pela injeção subcutânea de 100 µL de lipopolissacarídeo (LPS) (250 ng/100 µL) no saco escrotal do animal. Nos animais controle, foi feita a injeção de 100 µL de solução salina estéril. Duas horas após o estímulo, os camundongos foram anestesiados via i.p. com uma solução de 75 mg/kg de quetamina e 5 mg/kg de xilazina. Após os animais serem anestesiados, foi feita uma incisão na pele escrotal para expor o músculo cremaster do saco escrotal esquerdo. O testículo e o epidídimo foram separados a partir do músculo subjacente e foram transferidos para a cavidade abdominal. O músculo foi então distribuído ao longo de um pedestal opticamente claro e foi fixado ao longo das bordas com uma sutura 4-0 para visualização da microvasculatura (Ilustração 4) (SCHILTER et al., 2015).

O padrão de vasos observados foram as vênulas pós-capilares, e, no intuito de minimizar a variabilidade, o diâmetro das vênulas observadas eram entre 30 a 40 µm (NUNES-SILVA et al., 2014). O fluxo sanguíneo foi inferido pela velocidade das plaquetas e verificou-se ser semelhante em ambos os grupos de animais. Durante todo o experimento, os camundongos foram mantidos a 37°C e o músculo exposto foi continuamente irrigado com salina estéril aquecida. Os Leucócitos foram marcados por fluorescência pela administração intravenosa (i.v.) de Rodamina 6G (Sigma) (0,5 mg / kg de peso corporal), e filmados por um minuto usando-se um microscópio (Nikon, ECLIPSE 50i, 20x lente objetiva) equipado com uma fonte de luz fluorescente (epi-iluminação na 510- 560 nm, usando um filtro de emissão de 590 nm).

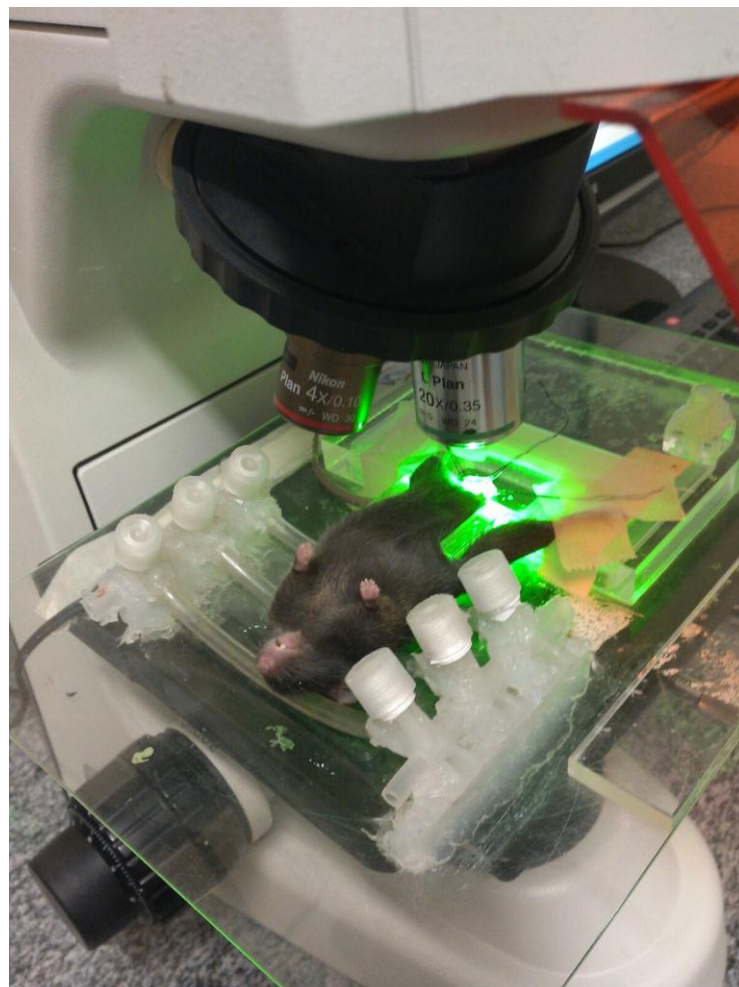


Ilustração 4. Exposição do músculo cremaster para filmagem no experimento de microscopia intravital.

Os números de rolamento e adesão dos leucócitos foram determinados *offline* durante análise da reprodução dos vídeos gerados. Os leucócitos foram considerados aderentes ao endotélio venular caso eles se mantivessem estacionários durante, pelo menos, 30 segundos. Já os leucócitos em rolamento foram definidos como as células brancas que se deslocaram a uma velocidade mais lenta do que a dos eritrócitos dentro de um determinado vaso. Em cada animal, pelo menos dois campos diferentes foram registrados e analisados para determinar a média do número total de leucócitos por campo.

4.17 Citometria de fluxo

Na citometria de células do sangue, após um e dois dias de infecção, os animais foram anestesiados e o sangue da veia cava inferior foi coletado em EDTA 2,68 mM. Já na citometria das células do BAL, após o período de infecção, os animais foram eutanasiados e

o lavado broncoalveolar foi coletado com solução contendo 0,5% de BSA em PBS 1X. As hemácias foram lisadas com água mili-Q e PBS 10x e as amostras centrifugadas a 1200 rpm por 7 minutos a 4°C. As células (10^6 células por poço), foram incubadas por 3 horas com 10 µL de brefeldina A (10 µg/mL) (eBioscience) em estufa a 37°C e 5% CO₂. As amostras então foram incubadas com 10 µL dos respectivos anticorpos monoclonais para marcação de superfície, conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), alofocianina (APC), brilhante violeta 421 (BV421), ficoeritrina-cianina 7 (PeCy7) ou piridina de clorofila (PerCP), assim como os anticorpos utilizados como controle de isotipo, durante 30 minutos a 4°C no escuro. Após incubação, as células foram lavadas com solução PBS 1X contendo 0,5% de BSA e centrifugadas a 1200 rpm por 7 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e as células fixadas com solução de PBS 1X contendo 2% de formaldeído, seguido de incubação por 20 minutos na temperatura ambiente. Após centrifugação, foi adicionado o tampão de permeabilização (PBS-Saponina 0,5% - PBS-S) seguido de incubação à temperatura ambiente por 10 minutos. Após nova centrifugação, foram adicionados os anticorpos conjugados para marcação intracelular, diluídos em PBS 1x, seguido de incubação por 30 minutos à temperatura ambiente no escuro. Após centrifugação, foram fixadas com solução de PBS-formaldeído 2%. As amostras foram analisadas pela leitura em citômetro de fluxo FACSCanto II (Becton Dickinson) e analisadas com auxílio do programa FlowJo 7.5.3 (TreeStar Inc., Ashland, OR). As células foram analisadas pela porcentagem de células positivas e intensidade de fluorescência para seleção das populações celulares. Os limites para cada quadrante de marcadores foram sempre analisados baseando-se nas populações negativas e nos isotipos controles.

4.18 Análise estatística

A análise estatística e a construção dos gráficos foram realizadas utilizando o software *GraphPad Prism* versão 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, EUA). As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram determinadas pela Análise de variância de uma via (One Way-ANOVA), seguida pelo método pós-teste de Newman-Keuls. Resultados envolvendo dois grupos experimentais foram analisados pelo teste t Student. Os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média. Todos os dados foram considerados estatisticamente significantes se $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Parâmetros relacionados ao consumo de etanol

5.1.1 O consumo crônico de etanol não altera o peso corpóreo dos animais durante o tratamento

No intuito de observar alterações de peso corporal decorrentes do consumo crônico de EtOH, foram avaliados diferentes parâmetros que poderiam ser afetados em relação à ingestão de álcool. Inicialmente, foi dosado a quantidade de solução alcoólica que os camundongos consumiram ao longo de todo o tratamento. Essa medida foi feita em cada caixa de animais pertencentes aos grupos EtOH e o grupo controle, que bebeu água (H₂O), sendo que, cada caixa abrigava cinco camundongos (n=15 animais por grupo). Conforme apresentado na figura 1A, os camundongos que consomem etanol ingerem uma menor quantidade de líquido, cerca de 110 mL por semana, enquanto os animais controle ingerem H₂O em torno de 130 mL por semana. Apesar da menor quantidade de líquido ingerido, a quantidade de álcool consumida durante as 12 semanas de tratamento é suficiente para gerar um consumo homogêneo de EtOH ao longo do tratamento. A quantificação de líquido ingerido foi mostrado em gramas de etanol por kg de animal. Na figura 1B, após as duas primeiras semanas, cuja porcentagem de etanol administrada é menor, há uma adaptação dos animais ao consumo forçado de etanol. A partir desse período, a quantidade de álcool consumida é homogênea ao longo das semanas, sendo cerca de 150 g de álcool por kg de animal. Além disso, pode-se observar na figura 1C que o consumo crônico de EtOH durante as 12 semanas não causou perda de peso corpóreo nos camundongos ao longo do tratamento em comparação com o grupo H₂O.

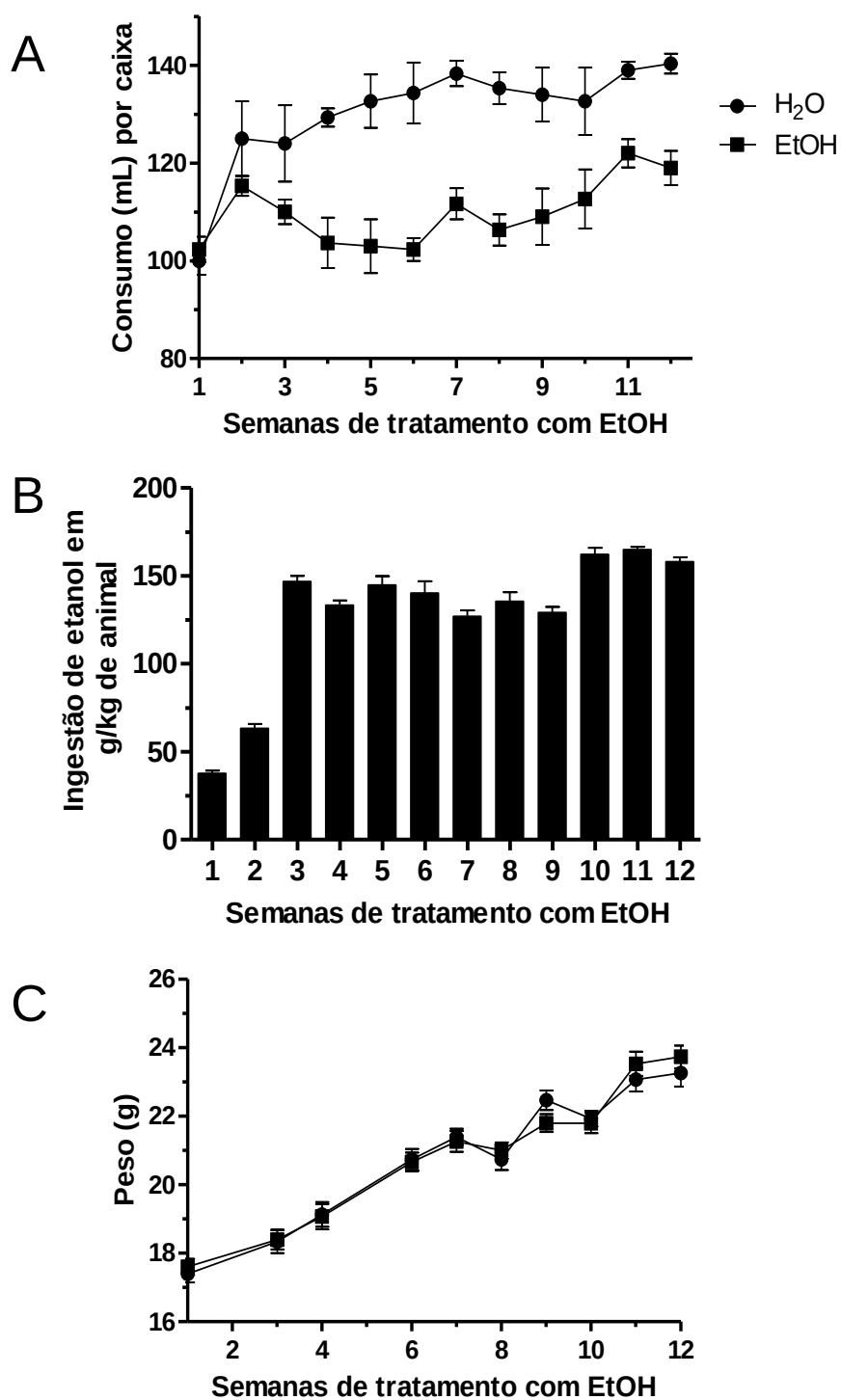


Figura 1. Quantidade de etanol ingerida pelos camundongos, peso corpóreo e níveis de glicose durante o tratamento. Após duas semanas de adaptação a ingestão de álcool, os animais (n = 15 animais por grupo) receberam a solução alcoólica a 20% v/v por 10 semanas. Durante todo esse período, a quantidade de etanol ingerida e o peso corporal foram avaliados semanalmente e comparados com o grupo controle que bebeu água (H₂O). (A) consumo em mL por caixa. (B) ingestão de EtOH em g por Kg de animal. (C) peso corpóreo (g) durante o tratamento. *Diferença significativa (p < 0.05).

5.1.2 O modelo murino de alcoolismo reproduz os mesmos níveis plasmáticos de álcool em humanos e não causa lesão hepática nos animais

Para avaliar se houve alteração os níveis plasmáticos de álcool após o consumo crônico de EtOH, foi realizada a dosagem de etanol no sangue dos camundongos por cromatografia gasosa. Os resultados mostraram que, após 12 semanas de consumo de álcool, os níveis de álcool no sangue dos camundongos chegaram a alcançar, em média, $204,51 \pm 0,19$ mg/dL (Figura 2A). A análise de lesão hepática se deu pela medida da enzima alanina amino transferase (ALT) no soro dos camundongos, após o tratamento com EtOH. Esta enzima é liberada no sangue em grandes quantidades quando há dano à membrana do hepatócito (BIANCHI et al., 2014). Conforme apresentado na figura 2B, o consumo crônico de EtOH não causou dano hepático nos animais (grupo EtOH: $32,45 \pm 10,43$ contra $36,74 \pm 3,36$ no grupo H₂O).

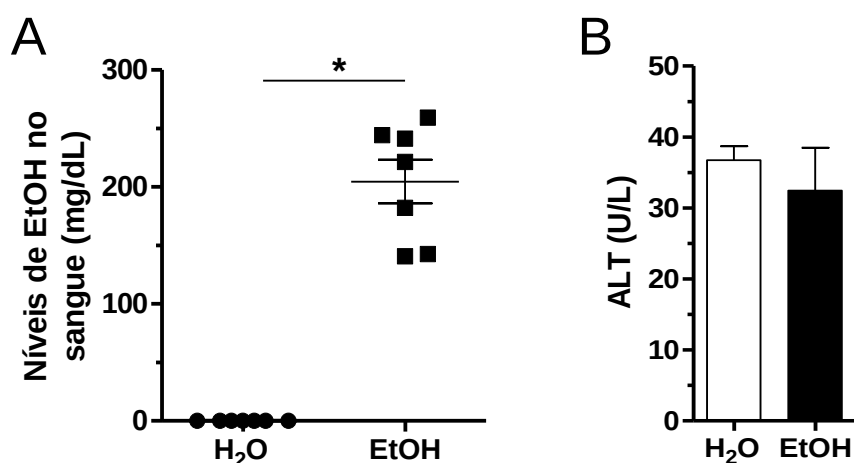


Figura 2. Níveis de etanol e lesão hepática após o tratamento com etanol. (A) Dosagem de EtOH sérico. Após as 12 semanas de consumo de álcool, o sangue dos camundongos (n=7 animais por grupo) foi coletado e a análise da concentração de etanol das amostras procedeu-se no cromatógrafo gasoso. (B) Concentração sérica da enzima hepática transaminase (ALT) nos camundongos após tratamento com etanol (n=4 animais por grupo). *Diferença significativa ($p < 0.05$).

5.2 O consumo crônico de etanol modula a resposta imune e inflamatória após infecção por *A. fumigatus*

5.2.1 O consumo crônico de etanol resultou em uma maior susceptibilidade após desafio com *A. fumigatus*

Para avaliar o efeito do consumo crônico de etanol na resposta imune do hospedeiro durante a infecção pelo fungo, verificou-se inicialmente a taxa de sobrevivência de animais tratados com álcool (EtOH) e controles (H₂O) após infecção intranasal com 3x10⁸ conídios de *A. fumigatus*, durante um período de 10 dias. Conforme demonstrado na figura 3A, após a infecção, os animais tratados com etanol apresentaram uma taxa de mortalidade significativamente maior (de 76%), em comparação aos animais controle que ingeriram água (52,4%).

Além da taxa de mortalidade, avaliou-se também a perda de peso dos animais como sinal de morbidade associada à infecção pelo fungo. Na figura 3B, pode-se observar que o tratamento com álcool não causou perda de massa corporal entre os grupos de animais não infectados (NI-EtOH e NI-H₂O). Os animais do grupo H₂O apresentaram perda significativa de massa corporal após a infecção, com um pico no 2º dia após a infecção - aproximadamente 15% - em comparação com os animais NI. No entanto, após o 6º dia de infecção, esses animais retornaram progressivamente ao índice observado nos animais NI. Por outro lado, a infecção nos animais do grupo EtOH resultou em uma perda significativa de massa corporal, cerca de 15%, a partir do 2º dia após a exposição ao fungo com um pico no 3º dia após infecção - cerca de 20% -, em comparação com o mesmo período nos animais NI EtOH e NI H₂O. Essa perda foi significativamente mais acentuada também na comparação entre os grupos EtOH e H₂O do 3º ao 7º dia após infecção por *A. fumigatus*.

Após este experimento, foram estabelecidos os dias um e dois após infecção para serem avaliados os parâmetros inflamatórios.

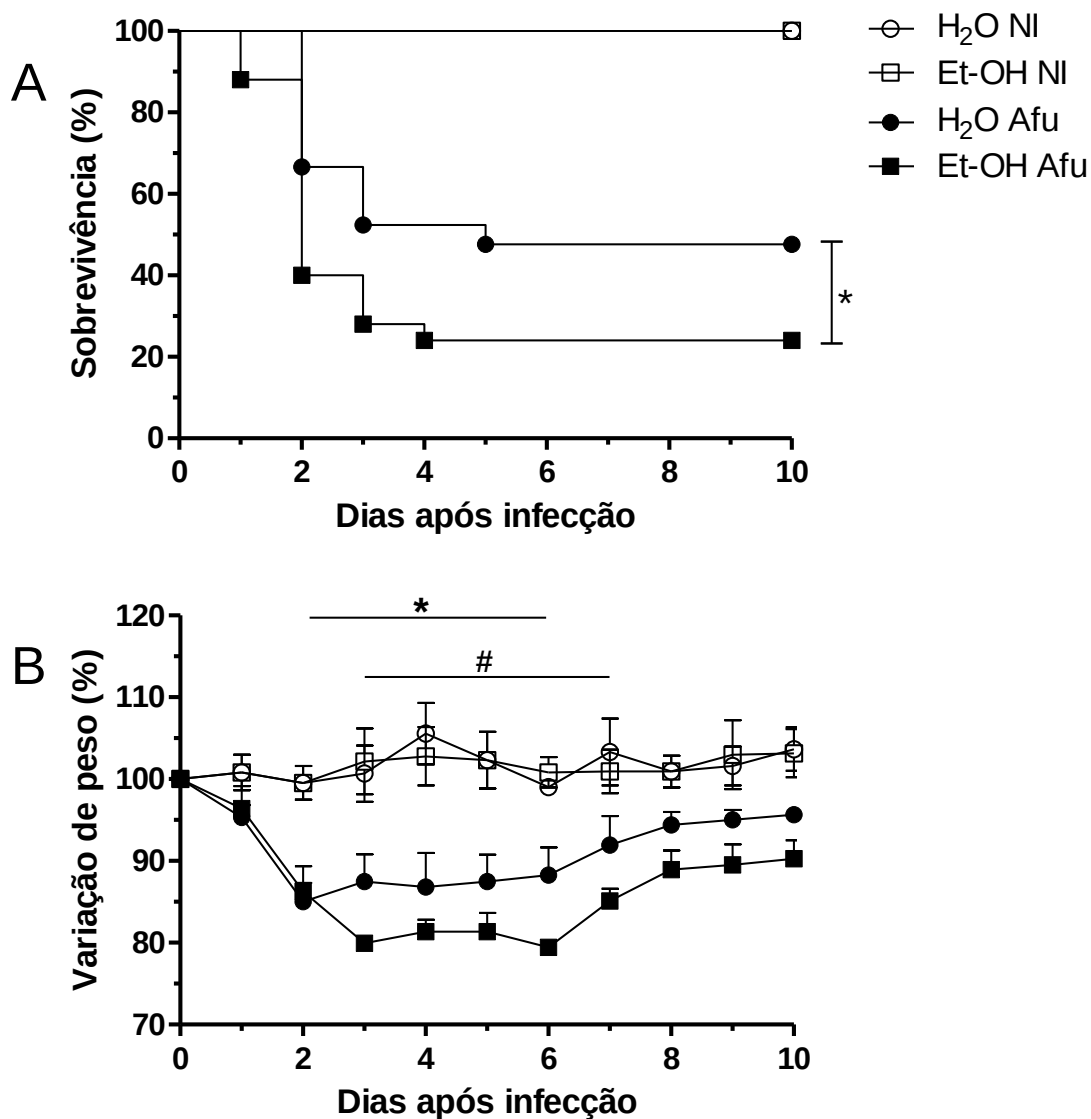


Figura 3. Animais alcoolistas são mais susceptíveis à infecção pulmonar por *A. fumigatus*. (A) Após o tratamento, os animais consumistas de etanol (EtOH) e controle (H₂O) foram inoculados por via intranasal com 3×10^8 conídios de *A. fumigatus* e monitorados durante um período de 10 dias para avaliação de sobrevida. Os resultados estão apresentados como a porcentagem de letalidade após infecção (n = 15 animais por grupo). (B) Avaliação do peso corporal após infecção em animais EtOH e H₂O. Os animais foram infectados e a variação da massa corporal em relação ao peso inicial dos animais (dia 0) foi mensurada por um período de 10 dias. Os animais não infectados (NI) receberam PBS pela mesma via. *Diferença significativa (P < 0.05) entre o grupo H₂O e os grupos NI H₂O e NI EtOH e #Diferença significativa entre os grupos EtOH e H₂O (p < 0.05).

5.2.2 A susceptibilidade dos camundongos consumistas de etanol foi associada à presença de carga fúngica elevada no pulmão após infecção

Para determinar o efeito do tratamento crônico de etanol no controle da infecção fúngica pelo hospedeiro, foi avaliada a carga fúngica no pulmão dos camundongos que consumiram álcool ou água, após a infecção pelo fungo *A. fumigatus*. O pulmão dos animais dos grupos EtOH e H₂O, após infecção pelo fungo *A. fumigatus*, também foi avaliado pela coloração de Grocott, que permitiu observar a presença de conídios do fungo no tecido pulmonar.

Tanto os animais H₂O quanto os animais EtOH apresentaram áreas de infiltrado inflamatório no parênquima pulmonar associadas à presença de um número elevado de conídios fúngicos no seu interior após um dia de infecção, caracterizados por estruturas arredondadas coradas em castanho escuro, (Figura 4 – cabeça de seta). No entanto, no 2º dia após infecção com *A. fumigatus*, os animais H₂O mostraram grande diminuição na quantidade de conídios no tecido pulmonar, enquanto os animais do grupo EtOH continuaram apresentando um número elevado de conídios no pulmão. Estes resultados foram corroborados pela quantificação da carga fúngica pulmonar após o cultivo em meio de cultura do homogenato do pulmão dos animais H₂O e EtOH.

Conforme demonstrado na figura 5A, após um dia de infecção os animais do grupo H₂O apresentaram conídios viáveis no espaço alveolar ($2,28 \times 10^6 \pm 0,22$), seguido de diminuição significativa no número de colônias fúngicas após dois dias de infecção ($1,4 \times 10^6 \pm 0,53$), demonstrando um alto *clearance* do patógeno neste grupo. Da mesma forma, foi observada recuperação de conídios viáveis após um dia de infecção no pulmão de animais do grupo EtOH ($2,9 \times 10^6 \pm 0,76$), no entanto, não foi observada diminuição no número de colônias fúngicas nesses animais após dois dias de exposição ao *A. fumigatus* ($3,15 \times 10^6 \pm 1,63$).

Além disso, após a infecção por *A. fumigatus*, nos camundongos consumistas de álcool, observou-se a presença de conídios que sofreram germinação e iniciaram o crescimento vegetativo, produção de hifas, no tecido pulmonar do hospedeiro (indicado pelas setas longas), o que não foi observado nos animais do grupo H₂O no período de um dia após a infecção (Figura 5B).

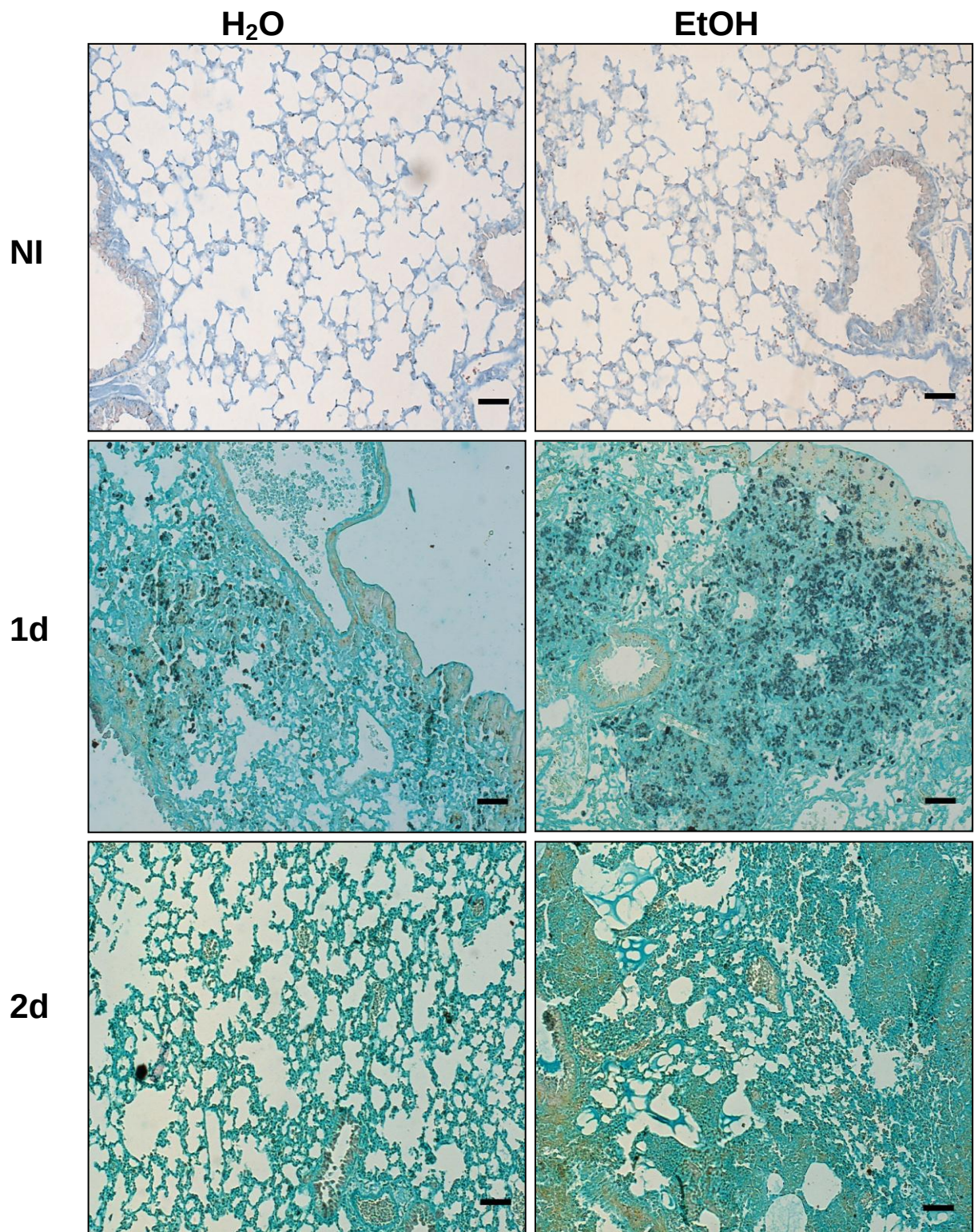


Figura 4. Animais consumistas de álcool possuem uma deficiência no *clearance* de *A. fumigatus* nos pulmões. Os pulmões dos animais EtOH e H₂O foram coletados um e três dias após a infecção por *A. fumigatus*. Os pulmões esquerdos foram fixados em formol 4% e embebidos em parafina. Em seguida foram corados pela técnica de Grocott para evidenciar as estruturas fúngicas (seta curta) (n = 3 a 5 camundongos por grupo). As barras representam 50 µm.

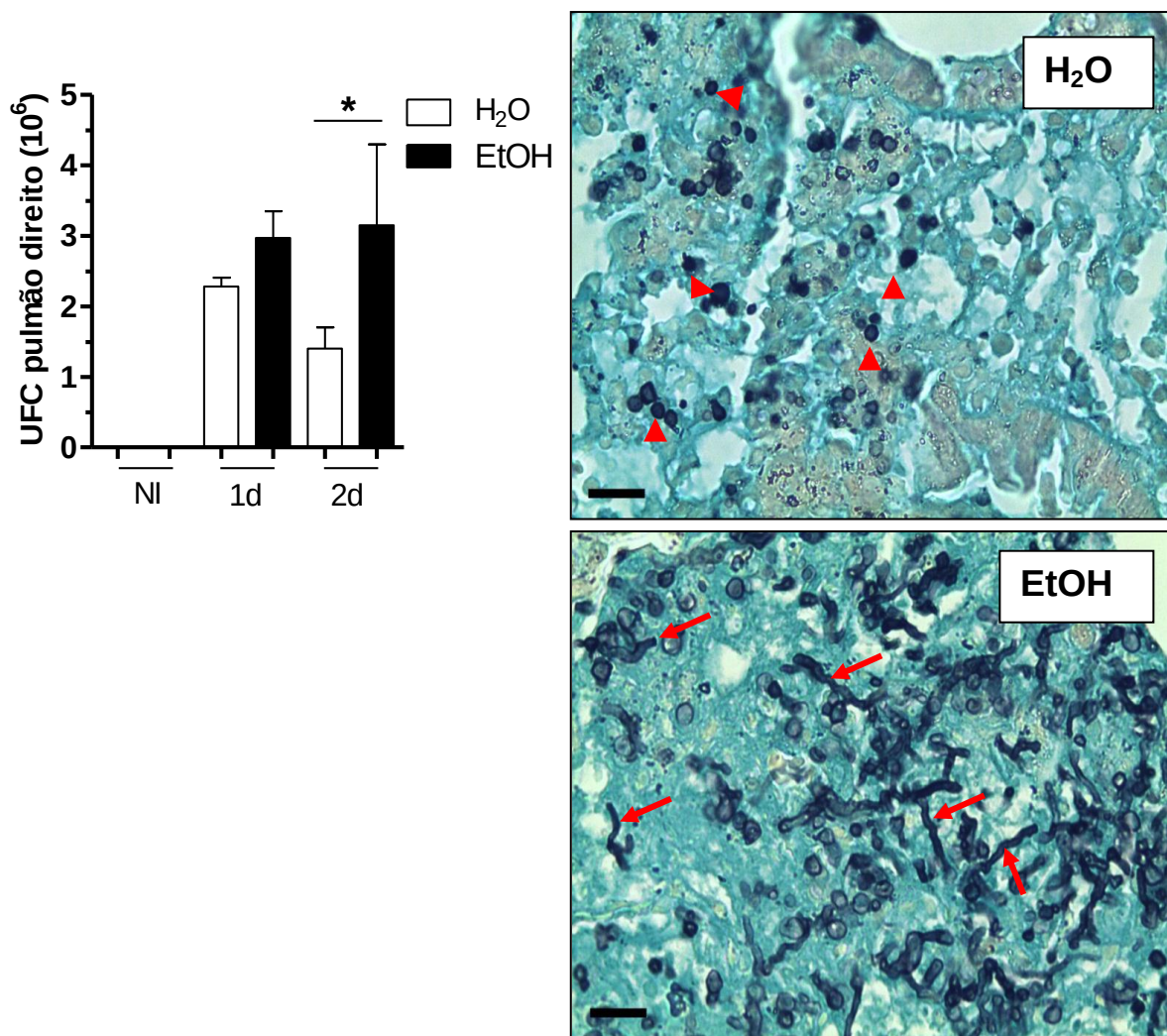


Figura 5. Animais consumistas de álcool apresentaram carga fúngica elevada no pulmão. (A) Animais EtOH e H₂O foram inoculados com 3×10^8 conídios de *A. fumigatus* e, após um e dois dias de infecção, foi realizada a avaliação da carga fúngica no pulmão dos animais. Os resultados estão expressos como o número de unidades formadoras de colônia (UFC) por pulmão direito (média $\pm$ SEM, n = 3 a 5 animais por grupo). *Diferença estatística (p < 0,05). (B) Os pulmões dos animais EtOH e H₂O foram coletados um e três dias após a infecção por *A. fumigatus*. Os pulmões esquerdos foram fixados em formol 4% e embebidos em parafina. Em seguida foram corados pela técnica de Grocott para evidenciar as estruturas fúngicas (estruturas de coloração escura) (n = 3 a 5 camundongos por grupo). As barras representam 25 μ m. As setas longas apontam conídios e as cabeças de seta apontam tubos germinativos.

5.2.3 O consumo crônico de etanol prejudica o influxo de neutrófilos e de linfócitos nos pulmões e nos alvéolos após infecção por *A. fumigatus*

Uma vez que os resultados anteriores revelaram a presença de carga fúngica elevada no pulmão dos animais EtOH, verificou-se em seguida a relação deste perfil com o recrutamento de leucócitos para o sítio de infecção. Os dados mostraram, na figura 6A, que a infecção com *A. fumigatus* induziu um aumento significativo no recrutamento de células inflamatórias para o espaço alveolar dos camundongos H₂O ($2,66 \times 10^6 \pm 0,76$), após um dia de infecção, em comparação com os animais não infectados. Já no 2º dia após infecção, houve uma diminuição no infiltrado inflamatório alveolar desses animais ($0,87 \times 10^6 \pm 0,53$). Nos animais EtOH, verificou-se aumento significativo no recrutamento de leucócitos para o espaço alveolar após três dias de infecção ($1,53 \times 10^6 \pm 0,50$), em comparação com os animais não infectados. No entanto, a quantidade de células recrutadas pelos animais EtOH é quase duas vezes menor em relação as células recrutadas pelo grupo H₂O.

Dentre as células totais, o principal tipo celular presente no foco infeccioso foram os neutrófilos, como observado na figura 6B. Os resultados mostraram novamente que os animais do grupo EtOH recrutaram um número significativamente menor de neutrófilos ($1,11 \times 10^6 \pm 0,35$) em comparação aos animais H₂O, após um dia de infecção por *A. fumigatus* ($2,01 \times 10^6 \pm 0,47$).

A avaliação do recrutamento de eosinófilos (Figura 6C) e macrófagos (Figura 6D) em resposta ao fungo nos camundongos indicou que, após infecção, houve um aumento no recrutamento dessas células de maneira equivalente tanto no grupo H₂O quanto nos animais do grupo EtOH, não sendo observadas diferenças significativas entre os grupos em relação a essas células após a infecção por *A. fumigatus*.

O recrutamento de linfócitos para os espaços alveolares nos camundongos aconteceu de maneira semelhante ao recrutamento de neutrófilos. Após a infecção, os animais H₂O recrutaram um número significativamente maior dessas células ($1,83 \times 10^5 \pm 6,42$) em comparação aos animais do grupo EtOH ($0,40 \times 10^5 \pm 0,19$), como mostrado na figura 6E.

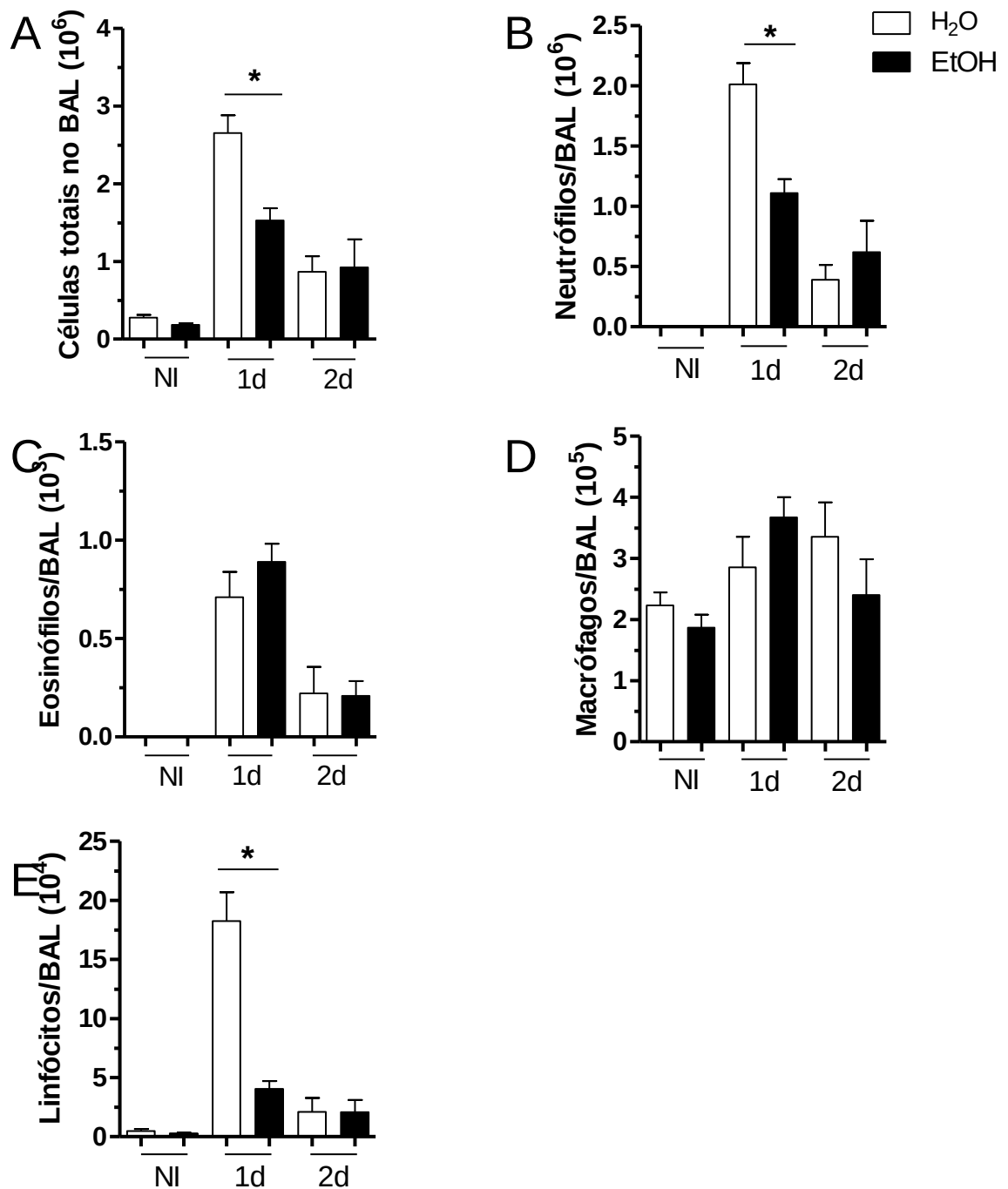


Figura 6. Camundongos alcoolistas apresentaram alteração no infiltrado inflamatório para o espaço alveolar após infecção com *A. fumigatus*. Animais H₂O e EtOH foram inoculados com 3×10^8 conídios de *A. fumigatus*. Após um e dois dias de infecção, o BAL foi coletado e realizou-se a quantificação dos leucócitos totais (A), neutrófilos polimorfonucleares (B), eosinófilos (C) macrófagos (D) e linfócitos (E). Animais não infectados (NI) receberam 40 μ L de PBS estéril pela mesma via de inoculação. Os resultados estão expressos como média $\pm$ SEM (n = 7 a 10 animais por grupo). *Diferença significativa (p < 0,05).

Após avaliar o perfil de células inflamatórias presentes nos alvéolos, também foi analisado o perfil do infiltrado celular no parênquima pulmonar dos animais tratados ou não com etanol durante o processo infeccioso. O acúmulo de leucócitos nos pulmões foi quantificado utilizando ensaios que avaliam a atividade de enzimas presentes em certas populações celulares, como a mieloperoxidase (MPO), enzima com elevada expressão em neutrófilos e, usada como marcador da presença dessas células nos tecidos (HUANG et al., 2016); a N-acetil-glicosaminidase (NAG), presente em macrófagos e, da mesma maneira, usada como marcador desse tipo celular (REINER et al., 1981); e a peroxidase eosinofílica (EPO), cuja atividade permite avaliar de maneira indireta o acúmulo de eosinófilos nos tecidos de interesse (STRATH; et al., 1985).

Inicialmente, observou-se que a infecção por *A. fumigatus* induziu um aumento significativo de neutrófilos no parênquima pulmonar dos animais H₂O após um dia de infecção (2362 ± 1023), enquanto no mesmo período, os camundongos do grupo EtOH recrutaram um número significativamente reduzido dessas células ($1408 \pm 546,5$). Já após dois dias de infecção, a quantidade de neutrófilos presentes em ambos os grupos foi a mesma (figura 7A).

Foi analisado também o acúmulo de macrófagos (figura 7B) e de eosinófilos (figura 7C) nos pulmões dos animais H₂O e EtOH. De maneira semelhante ao observado no recrutamento de células para as vias aéreas, após inoculação de *A. fumigatus*, houve um acúmulo de macrófagos e eosinófilos no parênquima pulmonar em ambos os grupos de animais. No entanto, não houve diferença significativa para essas células entre os grupos H₂O e EtOH em um mesmo período após infecção.

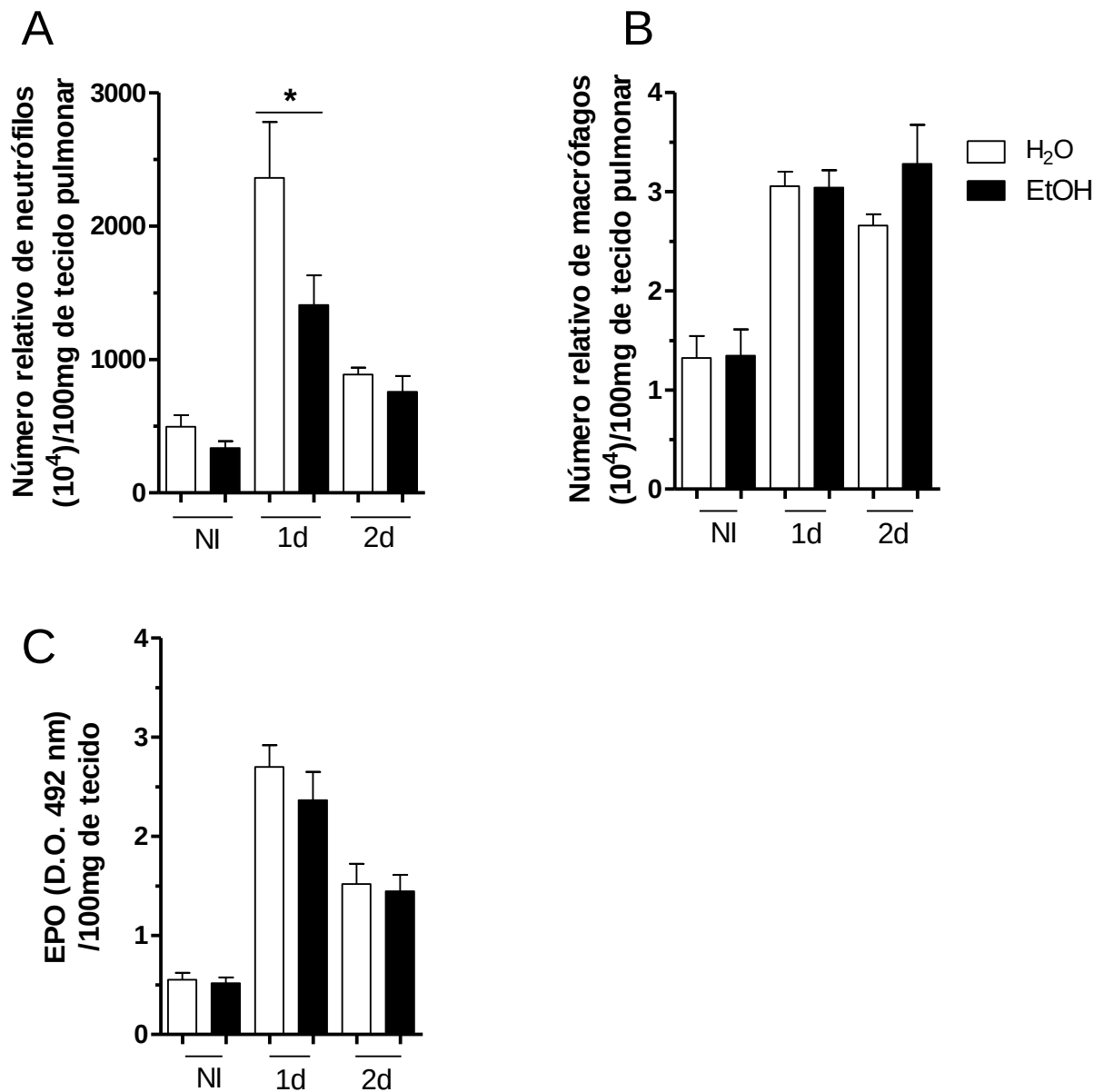


Figura 7. Animais que consumiram álcool cronicamente apresentaram redução da migração de neutrófilos para o parênquima pulmonar após um dia de infecção com *A. fumigatus*. Camundongos dos grupos H₂O e EtOH foram inoculados com 3×10^8 conídios de *A. fumigatus*. Após um e dois dias de infecção, os animais foram eutanasiados para coleta do pulmão e avaliação da atividade de MPO (A), NAG (B) e EPO (C). Animais não infectados (NI) receberam 40 μ L de PBS estéril pela mesma via de inoculação. Os resultados estão expressos como média $\pm$ SEM (n = 7 a 10 animais por grupo). *Diferença significativa (*p < 0,05).

5.2.4 Animais alcoolistas tiveram uma maior lesão pulmonar nas análises histológicas

A fim de avaliar o potencial de lesão induzido pela infecção pulmonar por *A. fumigatus*, foi realizada a análise histopatológica dos pulmões corados com HE. Essa análise demonstrou que o tecido pulmonar dos animais H₂O e EtOH não infectados, permaneceram íntegros e com suas características morfológicas preservadas. Por outro lado, a inoculação de *A. fumigatus* provocou alterações no parênquima pulmonar tanto dos animais H₂O quanto animais EtOH após um dia de infecção, com a presença de áreas de infiltrado inflamatório concentradas na região próxima aos brônquios, bronquíolos e periferia dos vasos sanguíneos, acometendo grande parte da estrutura pulmonar (Figura 8). Após dois dias de infecção, nos camundongos H₂O apresentaram redução do infiltrado pulmonar, enquanto nos animais EtOH esse infiltrado permaneceu acentuado e menos disperso.

A análise do escore histopatológico pontuou, em uma escala de 0 a 5, a gravidade e a distribuição da lesão inflamatória do tecido pulmonar (0 representou nenhuma patologia; 1 para mínima destruição e/ou inflamação de tecido; 2 para destruição e/ou inflamação suave de tecido; 3 para a destruição moderada e/ou inflamação de tecidos; 4 para destruição e/ou inflamação acentuada de tecido e 5 para a destruição e/ou inflamação intensa de tecido). (HUBBS et al., 1997). De acordo com os resultados obtidos, a distribuição da lesão inflamatória do tecido dos animais do grupo EtOH é significativamente maior em comparação aos camundongos H₂O ($6,83 \pm 2,08$ no grupo EtOH *versus* $3,10 \pm 1,34$ no grupo H₂O), após dois dias de infecção com *A. fumigatus* (Figura 8).

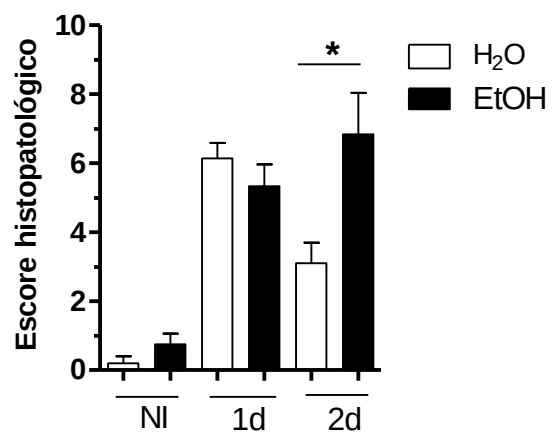
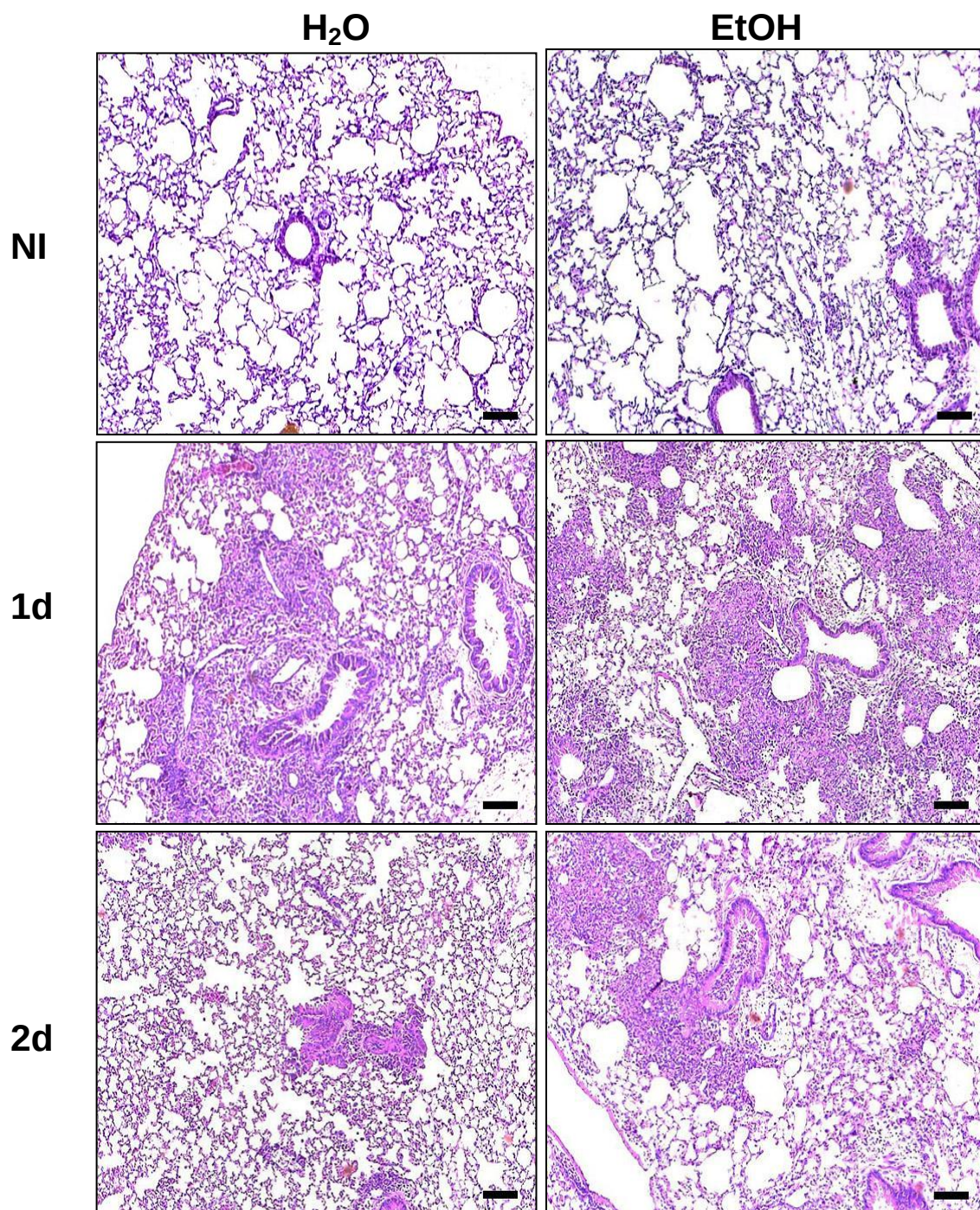


Figura 8. A infecção pelo fungo *A. fumigatus* resultou em lesão inflamatória pulmonar exacerbada nos animais EtOH. Animais H₂O e EtOH foram inoculados com 3×10^8 conídios de *A. fumigatus*. Após um e dois dias de infecção, os animais foram eutanasiados para coleta do pulmão e preparação dos tecidos para obtenção de cortes histológicos. As imagens mostram secções representativas de tecido pulmonar coradas com hematoxilina-eosina (n = 4 a 6 animais por grupo). Animais não infectados receberam PBS estéril pela mesma via. As barras representam 100 µm. A partir da avaliação das lâminas de hematoxilina-eosina, foram atribuídos valores que pontuaram de 0 a 5 a severidade e a distribuição da lesão causada pela inflamação, sendo que 0 representa ausência de lesão e 5 lesão grave.*Diferença significativa (p < 0.05).

5.2.5 O consumo de etanol não altera a permeabilidade vascular e nem a quantidade de leucócitos no sangue circulante

No intuito de entender o mecanismo subjacente a falha de migração de neutrófilos e linfócitos para o sítio infeccioso, foi avaliada a permeabilidade vascular e a distribuição de leucócitos circulantes no sangue nos animais H₂O e EtOH.

A permeabilidade vascular foi obtida pela análise do extravasamento de proteínas para os alvéolos. Conforme demonstrado na figura 9, pode-se observar que após a infecção por *A. fumigatus* houve um extravasamento elevado de proteínas que para os alvéolos em comparação com os animais não infectados. Contudo, tanto no 1º quanto no 2º dia após infecção, os grupos H₂O e EtOH não apresentaram diferenças na quantidade de proteínas extravasadas, demonstrando que o consumo crônico de álcool não afetou a permeabilidade vascular nesses indivíduos.

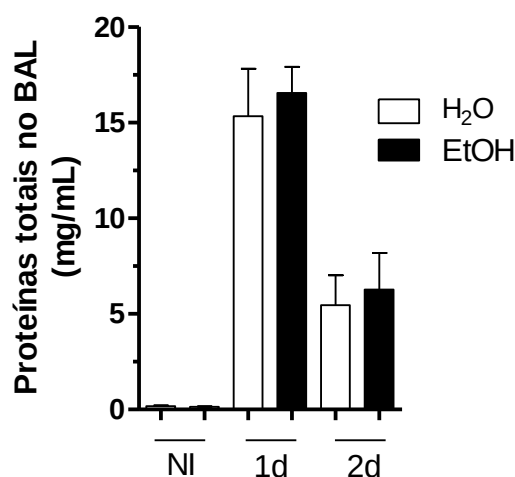


Figura 9. O tratamento com etanol não afetou a permeabilidade vascular nos animais. Animais H₂O e EtOH foram inoculados com 3×10^8 conídios de *A. fumigatus*. Após um e dois dias de infecção, foi obtido o BAL, que foi então centrifugado. A quantificação das proteínas totais do sobrenadante do BAL foi realizada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Animais não infectados (NI) receberam 40 μ L de PBS estéril pela mesma via de inoculação. Os resultados estão expressos como média $\pm$ SEM (n = 7 a 10 animais por grupo). *Diferença significativa (p < 0,05).

A avaliação das quantidades de diferentes leucócitos presentes no sangue circulante dos animais dos grupos H₂O e EtOH foi realizada pelo leucograma dos camundongos. Conforme demonstrado na figura 10A, o tratamento com etanol por 12 semanas não afetou

a quantidade de leucócitos totais circulantes no sangue dos animais, comparada ao grupo controle (H₂O). De maneira semelhante, os neutrófilos (Figura 10B) e as células mononucleares (Figura 10C) também revelaram níveis equivalentes da quantidade dessas células nos animais H₂O e EtOH.

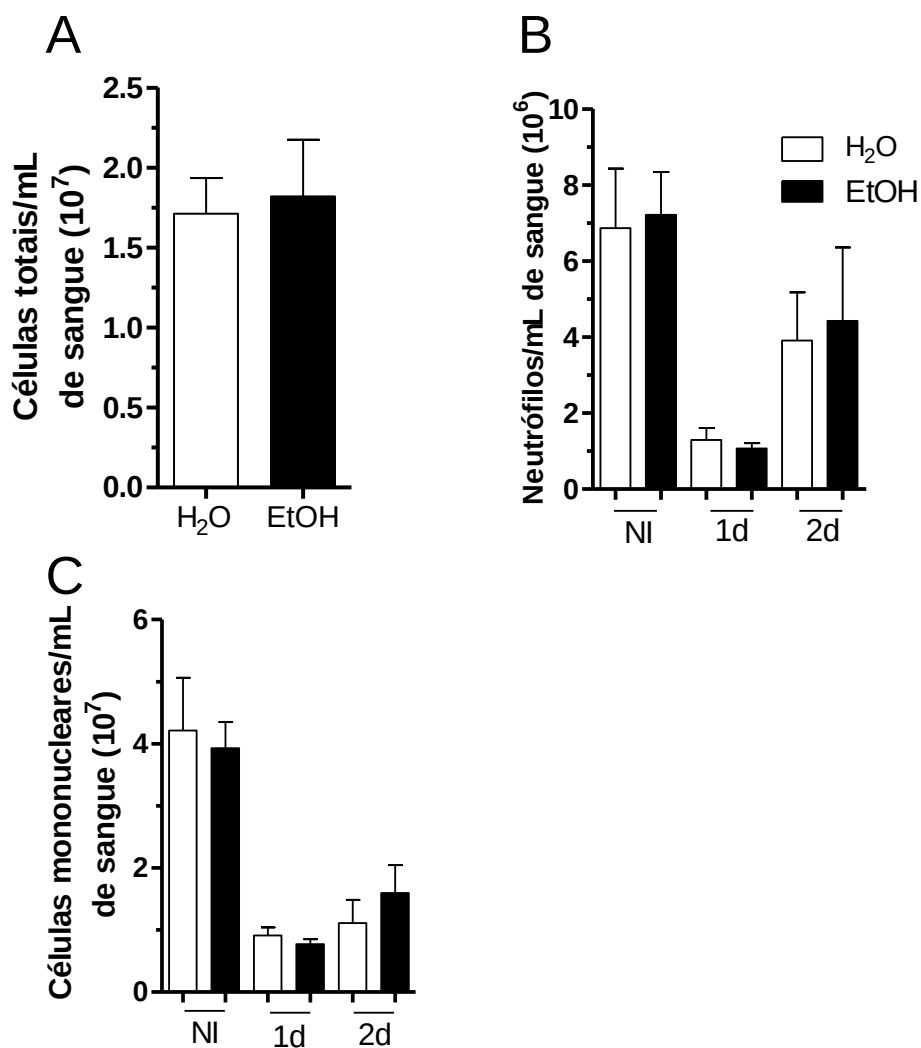


Figura 10. O consumo crônico de EtOH não afeta a quantidade de leucócitos circulantes no sangue de camundongos. Após 12 semanas de tratamento com EtOH, os animais foram inoculados com 3×10^8 conídios de *A. fumigatus* e o sangue foi coletado para contagem total (A) e diferencial de neutrófilos (B) e leucócitos mononucleares (C). A quantidade de cada tipo celular foi calculada a partir da porcentagem encontrada em relação ao número total de células. Os valores obtidos foram expressos em número de células por mL de sangue. Animais não infectados (NI) receberam 40 μ L de PBS estéril pela mesma via de inoculação. Os resultados estão expressos como média $\pm$ SEM ($n = 5$ a 7 animais por grupo). *Diferença significativa ($p < 0,05$).

5.2.6 O consumo crônico de etanol altera a concentração de mediadores inflamatórios após desafio com *A. fumigatus*

Uma vez que os resultados anteriores demonstraram que a infecção pelo fungo *A. fumigatus* em camundongos alcoolistas impediu o influxo principalmente de neutrófilos para as vias aéreas, e que isso culminou em uma carga fúngica elevada nos pulmões e consequentemente maior letalidade, o próximo passo foi verificar o perfil de produção de mediadores inflamatórios nas vias aéreas, que estão relacionados com o recrutamento de neutrófilos. O processo de migração de neutrófilos para um sítio infeccioso é induzido por uma série de mediadores inflamatórios, que podem ser classificados em citocinas não quimiotáticas e quimioatraentes (WAGNER; ROTH, 2000). Dentre os mediadores não quimiotáticos, se encontram, por exemplo, as citocinas TNF- α e IL-1. Já as quimiocinas CXCL1, CXCL2 e a proteína do complemento c5a são exemplos de moléculas quimioatraentes.

Conforme demonstrado na figura 11, pode-se observar um perfil de concentração da proteína do complemento c5a semelhante entre os grupos H₂O e EtOH em todos os tempos observados (Figura 11A). Em relação à citocina pró-inflamatória TNF- α , houve um aumento significativo após um dia de infecção, seguido de uma redução robusta desses após dois dias de infecção, tanto no grupo H₂O quanto no grupo EtOH (Figura 11B). Além disso, na comparação estatística entre os camundongos H₂O e EtOH, os dois grupos de animais mantiveram níveis parecidos dessa citocina um dia após infecção (1410 pg/mL $\pm$ 639 *versus* 1777 pg/mL $\pm$ 728 no grupo controle); e de maneira semelhante após dois dias de infecção (271,8 $\pm$ 13,22 *versus* 406,4 pg/mL $\pm$ 176 no grupo controle).

Com relação às citocinas quimiotraentes, CXCL1 e CXCL2, observou-se um aumento significativo na concentração de CXCL1 após um dia de infecção para os animais EtOH e H₂O (1797 pg/mL $\pm$ 650 *versus* 1634 pg/mL $\pm$ 261 no grupo H₂O), seguido de redução para níveis basais após dois dias de infecção (Figura 11C). Com relação à quimiocina CXCL2, os animais H₂O apresentaram níveis significativamente maiores após um dia de infecção e essa concentração permaneceu elevada após dois dias de infecção, enquanto os animais EtOH tiveram níveis significativamente mais elevados dessa quimiocina após o 1º dia de infecção em comparação com os animais controle (1132 pg/mL $\pm$ 143,5 *versus* 632,6 pg/mL $\pm$ 197,1 no grupo H₂O), seguido de diminuição significativa após dois dias de infecção (Figura 11D).

Com relação à concentração das citocinas IL-1 β , IL-17 e IL-10, verificou-se que a citocina IL-1 β aumentou significativamente após um dia de infecção, em ambos os grupos, embora os animais EtOH tenham apresentado níveis menores comparados ao grupo H₂O.

(359 pg/mL $\pm$ 111 *versus* 460 pg/mL $\pm$ 69,3 no grupo H₂O). Já no 2º dia de infecção, ambos os grupos retornaram a níveis basais de IL-1 β (Figura 11E).

Para a citocina IL-17, foi observado níveis elevados após um dia de infecção nos animais H₂O, que se mantiveram até dois dias de infecção. Os animais EtOH não apresentaram alteração na concentração dessa citocina após um e dois dias de infecção em relação aos animais não infectados. Em comparação com os animais H₂O, verificou-se que, após um dia de infecção, houve uma concentração menor dessa citocina nos alvéolos dos animais EtOH (12,88 pg/mL $\pm$ 14,27 *versus* 31,38 pg/mL $\pm$ 20,49 no grupo H₂O; p=0,058 (Figura 11F).

Além disso, foi avaliada a concentração da citocina anti-inflamatória IL-10. Observou-se, conforme esperado, que os níveis dessa citocina após um dia de infecção permaneceu semelhante aos níveis dos animais não infectados. No 2º dia após infecção pelo fungo, os animais H₂O apresentaram níveis significativamente elevados de IL-10, o que não foi observado nos animais EtOH (Figura 11G) (35,5 pg/mL $\pm$ 25,7 *versus* 96,3 pg/mL $\pm$ 28,2 no grupo H₂O).

Por fim, foi avaliada a concentração da quimiocina CXCL1 no soro dos animais após infecção por *A. fumigatus*. Os resultados mostraram, na figura 11H, que os animais H₂O que, tanto após um ou dois dias de infecção, a quantidade dessa quimiocina permaneceu semelhante aos níveis dos animais não infectados. Já para os animais EtOH, após um dia de infecção, houve aumento significativo da concentração de CXCL1 no soro em comparação com o grupo H₂O (1984 pg/mL $\pm$ 925,0 *versus* 541,4 pg/mL 288,0 no grupo H₂O).

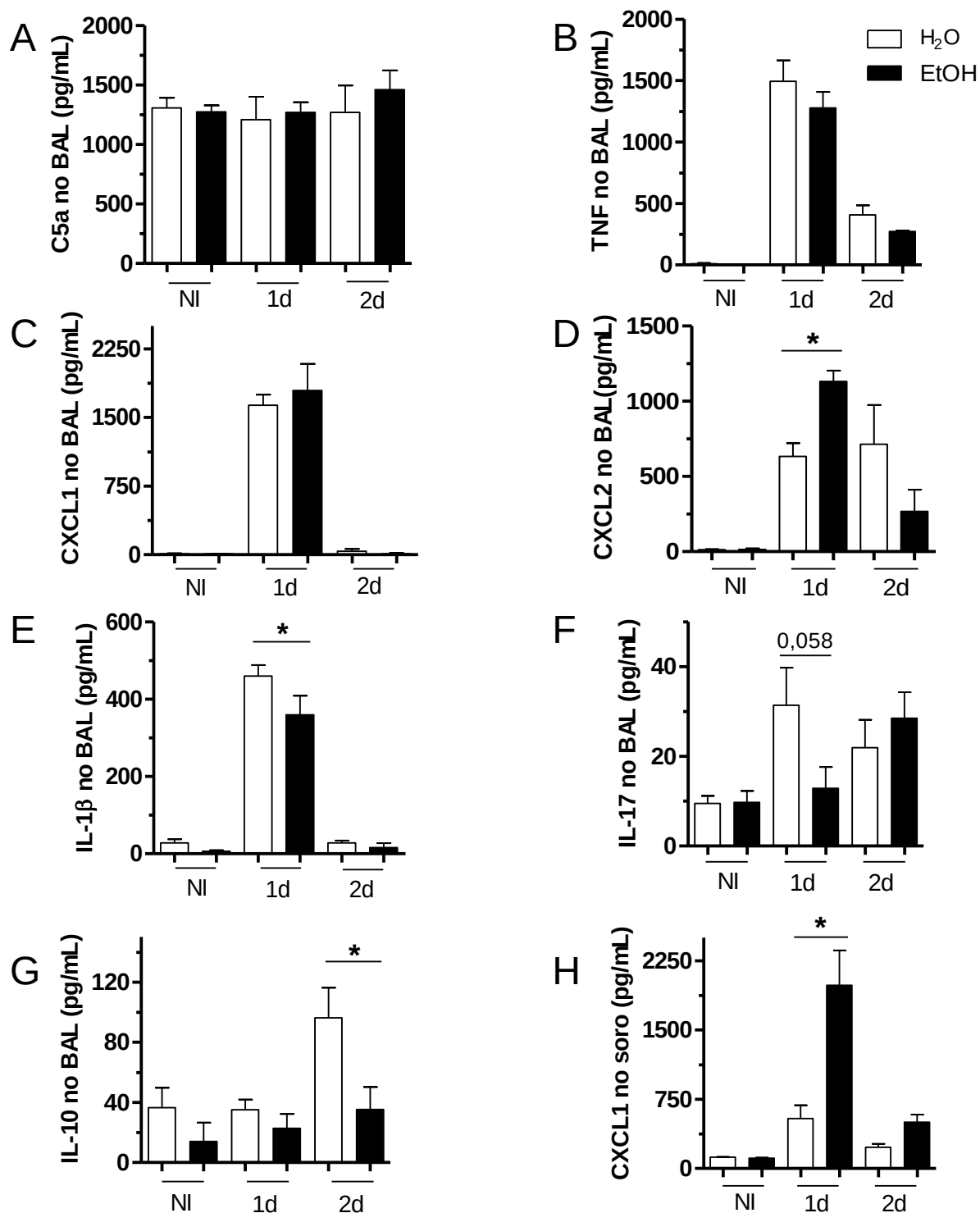


Figura 11. O consumo crônico de etanol altera a concentração de mediadores inflamatórios após desafio com *A. fumigatus*. Animais dos grupos EtOH e H₂O foram inoculados com 3×10^8 conídios de *A. fumigatus*. Após um e dois dias de infecção, os animais foram eutanasiados para coleta do BAL e do soro para avaliação da concentração dos mediadores C5a (A), TNF-α (B), CXCL1 (C), CXCL2 (D), IL-1β (E), IL-17 (F), IL-10 (G) e CXCL1 no soro (H) por ELISA. Animais não infectados (NI) receberam PBS pela mesma via de inoculação. Os resultados estão expressos como média ± SEM (n = 6 animais por grupo). * Diferença significativa (p < 0,05).

5.2.7 O consumo de etanol afeta o número de diferentes subtipos de linfócitos T no sítio da infecção

Os linfócitos T *helper* (Th) e a resposta pró-inflamatória Th17 tem grande importância na manutenção da resposta inflamatória neutrofílica e, conseqüentemente, no combate à infecções extracelulares (KOYASU; MORO, 2012). Considerando que o consumo crônico de etanol afeta não só o recrutamento de linfócitos, mas provavelmente afeta também a concentração de IL-17 no BAL após infecção por *A. fumigatus*, o próximo passo foi avaliar diferentes subtipos de linfócitos T e a produção de IL-17 nos linfócitos T CD4⁺ no BAL por citometria de fluxo após a inoculação do fungo.

Conforme demonstrado na figura 12A, após um dia de infecção os animais H₂O apresentam quantidade significativamente maior de células, evidenciada pela marcação de CD3⁺ CD4⁺ em comparação com animais não infectados, resultados que corroboram as contagens diferenciais observadas no BAL (Figura 6E). Já os animais do grupo EtOH apresentaram redução de células CD4⁺ em comparação com o grupo H₂O ($5,43 \times 10^4 \pm 0,80$ versus $9,07 \times 10^4 \pm 3,702$ no grupo H₂O). O mesmo foi observado para as células CD3⁺ CD4⁺ IL-17⁺ ($0,20 \times 10^4 \pm 0,49$ no grupo EtOH versus $1,36 \times 10^4 \pm 1,29$ no grupo H₂O), evidenciando que linfócitos produtores de IL-17 apresentam-se em menor número nas vias aéreas de animais alcoolistas, o que pode comprometer a sinalização mediada pela citocina IL-17 nestes animais (Figura 12B).

Com relação à quantidade de células com marcação CD3⁺ CD8a⁺ no BAL, não houve diferença na quantidade de células entre os grupos infectados H₂O e EtOH (Figura 12C). Por outro lado, as células *natural killer* (NK), marcadas com NK1.1 (CD3⁺ NKT⁺), apresentaram-se em maior número nas amostras dos animais tratados com álcool por 12 semanas em comparação aos animais NI. Após infecção, a quantidade de células CD3⁺ NKT⁺ retornam aos níveis basais (Figura 12D).

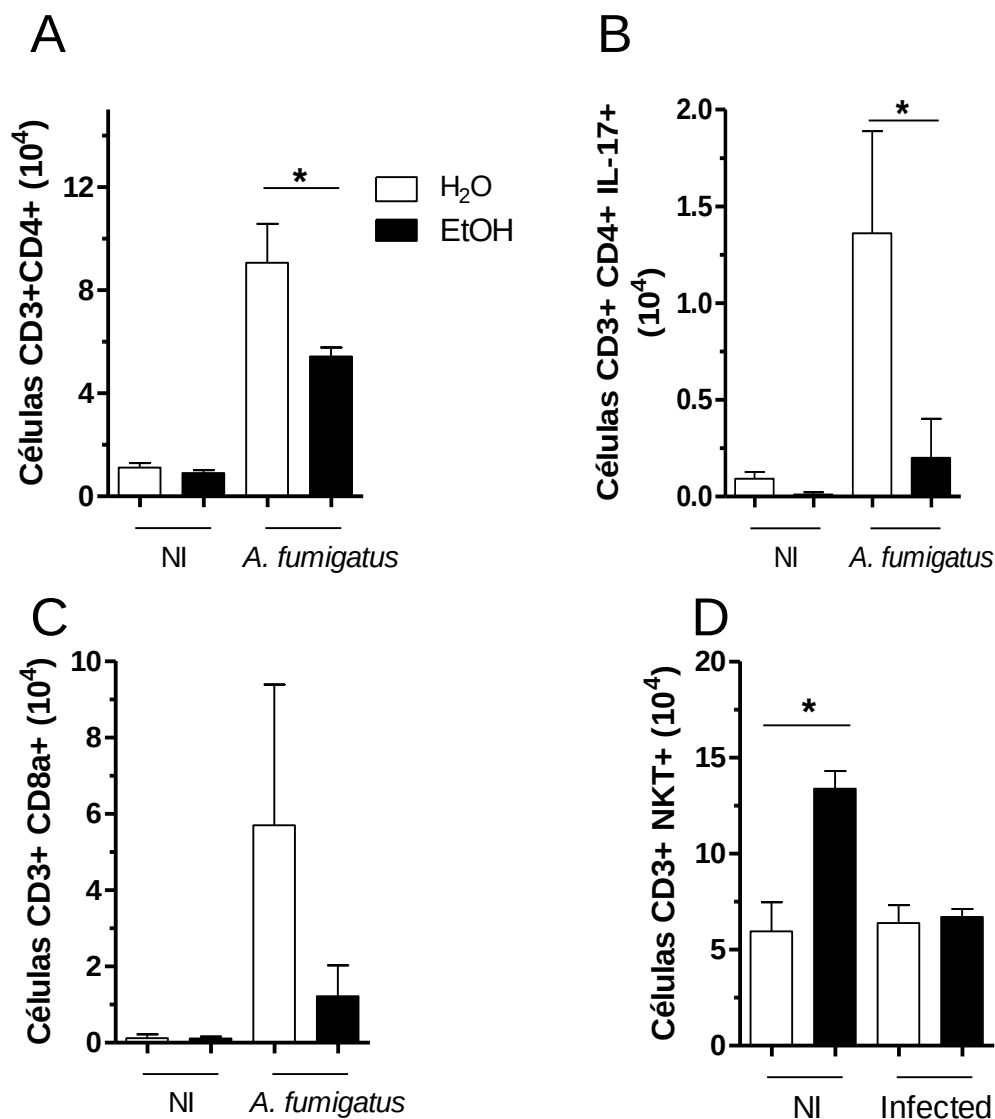


Figura 12. O consumo de etanol afeta o número de diferentes subtipos de linfócitos T no sítio da infecção. Animais H₂O e EtOH foram inoculados com 3×10^8 conídios de *A. fumigatus*. Após um dia de infecção, foi obtido o BAL e realizada a marcação de superfície e intracelular com os respectivos anticorpos monoclonais. A leitura das amostras foi feita em citômetro de fluxo e as análises no programa FlowJo 7.5.3. (A) Células CD3⁺ CD4⁺; (B) Células CD3⁺ CD4⁺ IL-17⁺; (C) CD3⁺ CD8a⁺; (D) CD3⁺ NKT⁺. Animais não infectados (NI) receberam 40 μ L de PBS estéril pela mesma via de inoculação. Os resultados estão expressos como média $\pm$ SEM (n = 5 a 6 animais por grupo). *Diferença significativa (p < 0,05).

5.2.8 A deficiência no recrutamento de neutrófilos nos camundongos alcoolistas é associada ao menor rolamento e adesão dessas células às vênulas pós-capilares

No intuito de avaliar se a inibição parcial do influxo de neutrófilos para os espaços alveolares nos animais alcoolistas está relacionada a deficiências no processo de migração celular, foi utilizado um modelo murino de inflamação no músculo cremaster, conhecido por ser usado para visualização das etapas iniciais da migração de leucócitos polimorfonucleares (PMNs) através das vênulas pós-capilares (SCHILTER et al., 2015). Após estímulo com LPS, os animais foram anestesiados, o músculo cremaster foi exposto e a sua visualização se deu por microscopia intravital. Na figura 13A podem-se observar imagens ilustrativas da adesão de leucócitos a microvasculatura do cremaster. Nos camundongos que não sofreram estimulação (salina), tanto tratados com EtOH quanto os controles H₂O, apresentam uma pequena quantidade de leucócitos aderidos ao endotélio. No entanto, após estímulo com LPS, os animais H₂O apresentaram intensa atividade de rolamento e adesão celular ao endotélio, o que não foi observado para os animais EtOH. Corroborando esses dados, na figura 13B é apresentada a quantificação da adesão e também do rolamento dos leucócitos, sendo que a linha tracejada representa os animais não estimulados (rolamento: $31,88 \pm 15,86$ versus $53,63 \pm 10,13$ no grupo H₂O e adesão: $7,32 \pm 1,95$ versus $4,31 \pm 1,03$ no grupo H₂O).

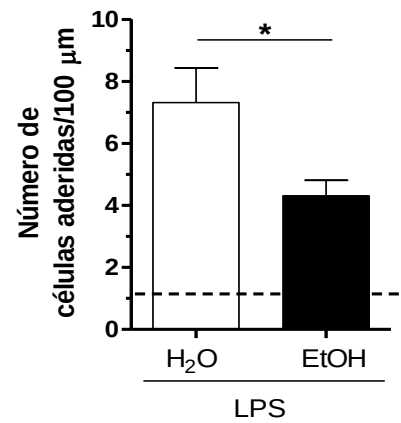
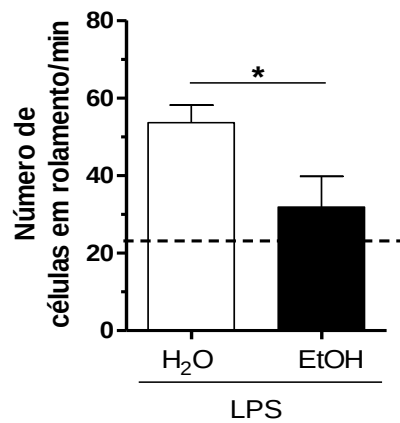
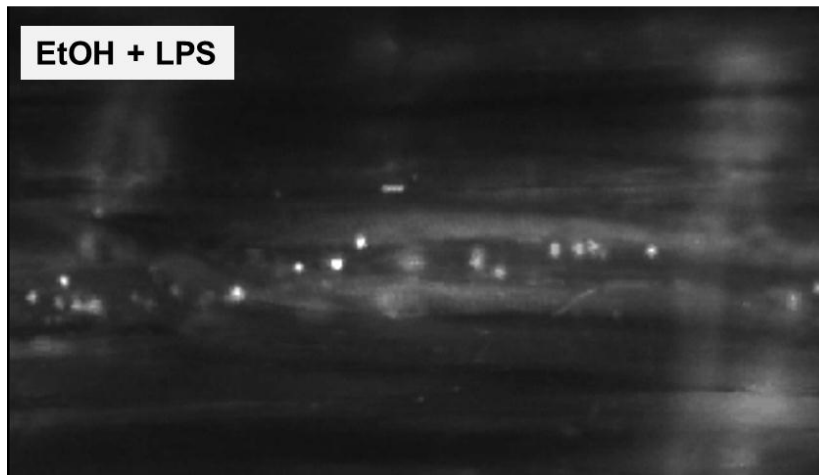
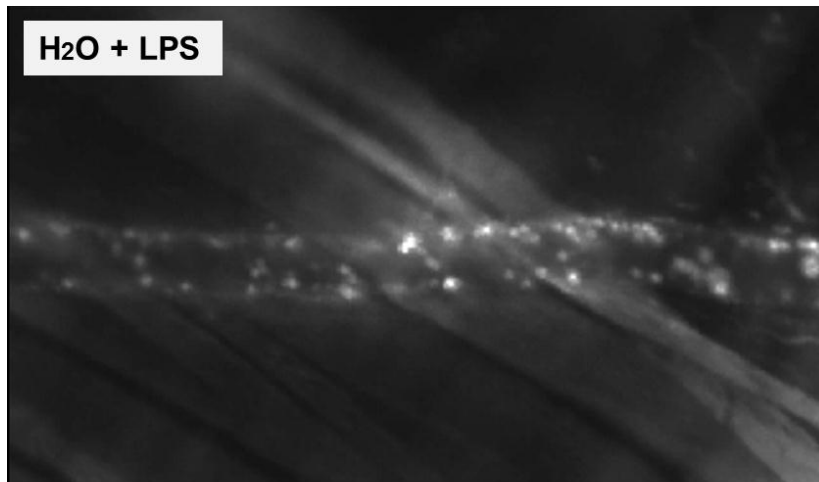
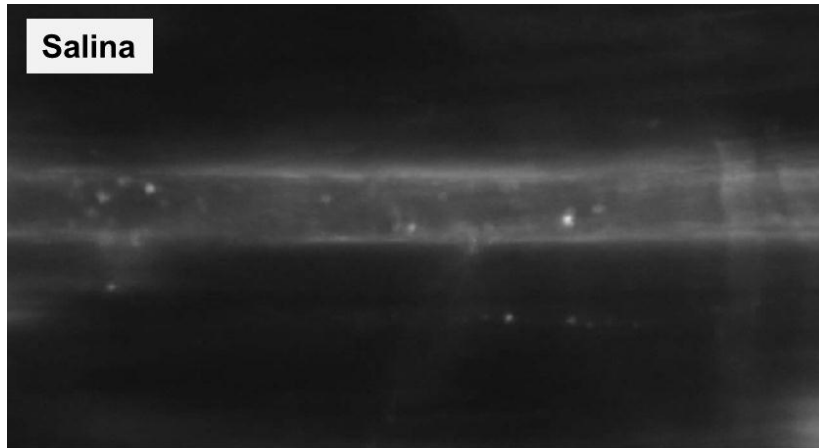


Figura 13. Camundongos consumistas de etanol apresentam menor rolamento e adesão de leucócitos ao endotélio vascular. Animais H₂O e EtOH, após estímulo com LPS, foram anestesiados e músculo cremaster foi exposto e a sua visualização se deu por microscopia intravital. Os números de rolamento e adesão dos leucócitos foram determinados *offline* durante análise da reprodução dos vídeos gerados. Em cada animal, pelo menos dois campos diferentes foram registrados e analisados para determinar a média do número total de leucócitos por campo. (A) imagens ilustrativas da adesão de leucócitos ao endotélio. (B) quantificação do rolamento e adesão de leucócitos. Animais controle (linha tracejada) receberam o veículo (salina) no lugar do estímulo. * Diferença significativa ($p < 0,05$) ($n = 3$ a 6 animais por grupo).

5.2.9 A deficiência na migração de neutrófilos em animais consumistas crônicos de etanol após infecção por *A. fumigatus* parece estar relacionada com a menor expressão de CXCR2 na membrana dos neutrófilos circulantes do sangue

Evidências bem sedimentadas na literatura descrevem, principalmente em quadros de sepse severa, que a deficiência na migração de neutrófilos para as vias aéreas é devido, também, a ausência de expressão do receptor de membrana CXCR2 (receptor para as quimiocinas CXCL1 e CXCL2) (ALVES-FILHO et al., 2009). O primeiro indício da falta desse receptor na superfície celular é a presença dos seus ligantes no sangue. Considerando a grande quantidade dessa quimiocina no soro dos animais EtOH após infecção por *A. fumigatus* (mostrado na figura 12H) foi avaliado, por citometria de fluxo, se o consumo crônico de etanol afetou a expressão desse receptor nos neutrófilos dos animais que consumiram álcool após inoculação do fungo *A. fumigatus*.

Conforme demonstrado na figura 14A, um dia após infecção, os animais EtOH apresentaram uma menor quantidade de células do sangue positivas para Ly6G (marcador de neutrófilos) com marcação CXCR2⁺ (células Ly6G⁺ CXCR2⁺) em comparação aos animais H₂O, mas que não foi estatisticamente diferente ($p=0,06$) ($1,18 \times 10^4 \pm 0,66$ versus $3,45 \times 10^4 \pm 1,79$ no grupo H₂O). Também foi avaliada a expressão de CD11b e CD62L nas células positivas para Ly6G e não houve diferença entre os grupos infectados H₂O e EtOH em relação à quantidade de células com marcação Ly6G⁺ CD11b⁺ (Figura 14B) e com a marcação Ly6G⁺ CD62L⁺ (Figura 14C) nas células do sangue após infecção por *A. fumigatus*.

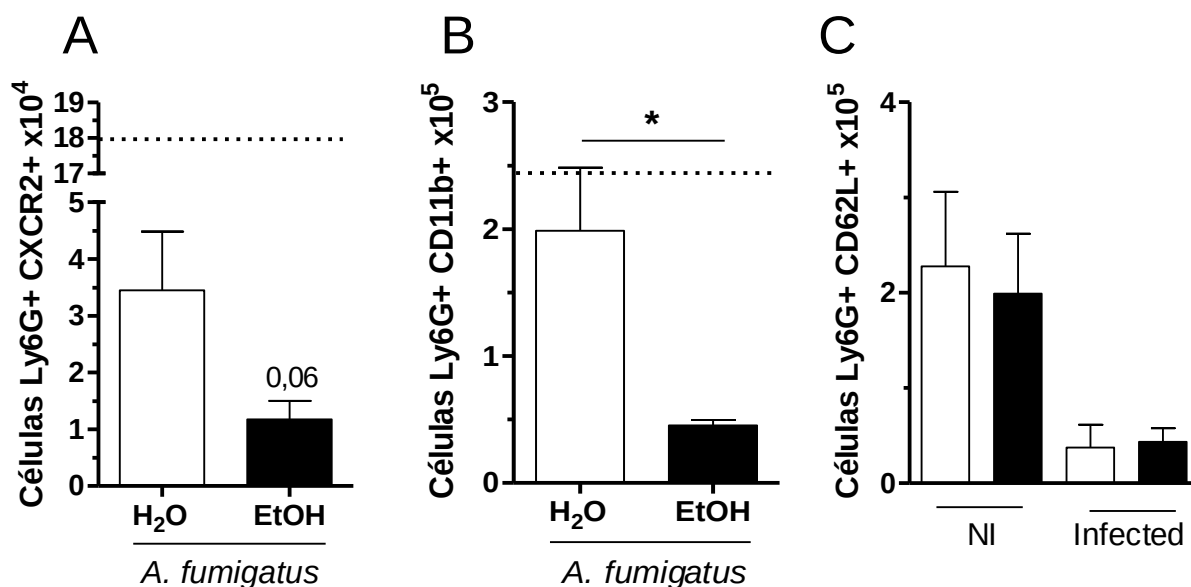


Figura 14. A deficiência na migração de neutrófilos em animais consumistas crônicos de etanol após infecção por *A. fumigatus* parece estar relacionada com a menor expressão de CXCR2 na membrana dos neutrófilos circulantes do sangue. Animais H₂O e EtOH foram inoculados com 3x10⁸ conídios de *A. fumigatus*. Após um dia de infecção, foi obtido o sangue e realizada a marcação de superfície com os respectivos anticorpos monoclonais. A leitura das amostras foi feita em citômetro de fluxo e as análises no programa FlowJo 7.5.3. (A) Células Ly6G⁺ CXCR2⁺; (B) células Ly6G⁺ CD11b⁺; (C) células Ly6G⁺ CD62L⁺. Animais não infectados (NI) receberam 40 µL de PBS estéril pela mesma via de inoculação. Os resultados estão expressos como média ± SEM (n = 5 a 6 animais por grupo). As linhas tracejadas representam as quantidades de células identificadas nos animais controle não infectados (NI). *Diferença significativa (p < 0,05).

6 DISCUSSÃO

O consumo de etanol está presente na história da civilização desde os seus primórdios (LIEBER, 2005). Além disso, os relatos sobre a relação entre uma maior susceptibilidade a infecções pulmonares em indivíduos que consumiram etanol datam do século XIII (MOLINA et al., 2010). Desta forma, diversos trabalhos recentes têm mostrado que a exposição ao etanol, seja ela aguda ou crônica, é prejudicial no controle de uma resposta inflamatória infecciosa (LUONG et al., 2015; OHAMA et al., 2014; PARLET et al., 2015; YELIGAR et al., 2012). No presente estudo, caracterizamos os efeitos do consumo crônico de etanol na resposta imune e inflamatória frente a infecção causada por *A. fumigatus*, em um hospedeiro imunocompetente. Os principais achados foram: (i) após o consumo crônico de etanol, a carga fúngica pós-infecção por *A. fumigatus* foi mais elevada e consequentemente resultou em uma maior susceptibilidade do hospedeiro alcoolista a infecção; (ii) houve uma falha de rolamento, adesão e, consequentemente, migração de neutrófilos e de linfócitos para o foco infeccioso nos animais que consumiram etanol, embora a redução do influxo desses leucócitos não foi relacionada a diminuição delas no sangue circulante; (iii) o consumo crônico de etanol causa um desbalanço na produção de citocinas e quimiocinas importantes para coordenar toda a resposta inflamatória mediada por neutrófilos; (iv) os neutrófilos circulantes de animais que consumiram cronicamente etanol apresentaram expressão reduzida do receptor de quimiocinas CXCR2, sendo prejudicial a quimiotaxia dessas células e prejudicando desta forma a montagem de uma resposta adequada em combater a infecção. Corroborando assim com dados relatados na literatura.

Durante todo o tratamento, os animais consumiram uma quantidade homogênea de etanol, que foi quantificado pela análise do consumo em g de etanol por Kg de animal. Apesar da menor ingestão de líquido pelos camundongos que foram forçados a ingerir etanol, o modelo murino de consumo crônico utilizado neste trabalho foi capaz de reproduzir altos níveis plasmáticos de álcool (YELIGAR et al., 2012). Utilizando o mesmo modelo de tratamento com etanol descrito neste estudo, Gonzaga e colaboradores mostraram que os níveis de etanol no sangue permanecem no intervalo de 30 a 40 mM (GONZAGA et al., 2015). No presente estudo, os níveis plasmáticos de etanol chegaram a aproximadamente 45 mM, sem causar perda de peso pelos camundongos. Assim, os efeitos nos parâmetros inflamatórios observados neste estudo ocorrem em animais com níveis de etanol no sangue que estão dentro daqueles encontrados nos seres humanos após o consumo de etanol. Além disso, não foi observada lesão hepática nos animais após o tratamento com o etanol,

avaliado pela liberação da enzima ALT (MARQUES et al., 2012), sugerindo que o modelo utilizado nesse estudo não causou falência ou danos agudos aos hepatócitos.

O inóculo do modelo de infecção pulmonar por *A. fumigatus* utilizado, representa a dose letal capaz de causar letalidade em 50% dos animais, chamada DL₅₀ (TAO et al., 2015). Já foi demonstrado por Dixon e colaboradores (1989) que camundongos imunossuprimidos, infectados com *A. fumigatus*, tiveram uma relação direta entre a letalidade e a carga fúngica presente no inóculo. No entanto, neste trabalho, resultados apontaram que a letalidade nos camundongos alcoolistas foi mais acentuada, evidenciando o impacto do consumo de etanol na maior susceptibilidade à aspergilose. A letalidade foi correlacionada também com uma maior carga fúngica apresentada pelos animais que consumiram álcool cronicamente. Já na análise da histopatologia pulmonar utilizando a coloração de Grocott (coloração específica para fungos), pôde-se observar que no tecido dos animais alcoolistas houve germinação de conídios, indicando que estes animais sofreram invasão tecidual pelo fungo. Além disso, a perda de massa corporal foi associada como um sinal de morbidade vinculado à aspergilose pulmonar. Sendo que a perda de peso corporal foi mais intensa no intervalo de três a seis dias após infecção nos animais tratados com etanol.

De maneira semelhante, um estudo utilizando um modelo de infecção pulmonar por *Pseudomonas aeruginosa* mostrou que a perda de massa corporal que ocorreu nos animais foi devido ao processo inflamatório infeccioso, já que não há diferenças entre os grupos infectados e não infectados em relação a ingestão de alimentos e alterações na mecânica pulmonar. No entanto, a perda de peso foi acentuada na medida em que houve maior produção de citocinas e quimiocinas inflamatórias, tais como TNF- α , IL-1 β , IL-6, CXCL2/MIP-2, CXCL1/KC no BAL. Todos estes mediadores inflamatórios também desempenham um papel importante na infecção por *A. fumigatus* (DAGENAIS; KELLER, 2009; MARGALIT; KAVANAGH, 2015).

As características histológicas observadas na coloração de HE indicaram que houve uma reação inflamatória intensa, com grande severidade e distribuição da lesão no parênquima pulmonar, tanto no grupo tratado com etanol quanto no grupo controle, após um dia de infecção por *A. fumigatus*. Para os animais controle, a lesão inflamatória foi bastante reduzida no 2º dia de infecção, o que não foi observado nos animais alcoolistas. Na associação entre a análise histológica, permeabilidade vascular e carga fúngica, os animais controle, que beberam água, apresentaram permeabilidade vascular elevada após um dia de infecção, assim como o infiltrado de células no parênquima pulmonar e também o escore histopatológico. Já no segundo dia de infecção, a permeabilidade vascular diminuiu da mesma forma como o infiltrado de células e a carga fúngica. Por outro lado, os animais que

consumiram etanol cronicamente, não tiveram essa correlação, já que após dois dias de infecção, a permeabilidade vascular é diminuída, mas ainda se observa uma lesão inflamatória grave e carga fúngica elevada no pulmão.

O padrão de resposta celular no sítio da infecção também foi avaliado, sendo que essa análise é essencial para compreender as interações patógeno-hospedeiro no desfecho de uma pneumonia (MEHRAD; STANDIFORD, 1999). Os macrófagos são células fundamentais para o desenvolvimento, progressão e resolução da inflamação (ZHOU et al., 2014), desempenhando um papel crucial na fagocitose de conídios inalados e sendo também responsáveis pela ativação da resposta pró-inflamatória no combate ao *A. fumigatus* (LATGÉ, 2001). Um estudo recente demonstrou que o consumo crônico de etanol causa disfunção dos macrófagos alveolares devido ao estresse oxidativo gerado após seu metabolismo. Como consequência, após desafio com *Klebsiella pneumoniae*, essas células não conseguem combater o patógeno (YELIGAR et al., 2014). Neste trabalho não foi observado diferenças significativas no recrutamento de macrófagos dos animais alcoolistas ou do grupo controle, tanto nos alvéolos quanto no tecido pulmonar. Já os eosinófilos, granulócitos com perfil de resposta Th2, desempenham um importante papel na patogênese de doenças parasitárias e alérgicas, como a asma e a aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA) (ENG; DEFELICE, 2016). Experimentos com camundongos deficientes para GATA1 (*GATA-binding factor 1*), um importante fator de transcrição para diferenciação de eosinófilos, tiveram a resposta imune prejudicada, com menor clearance fúngico e diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6, IL-17A, G-CSF, GM-CSF e CXCL1/KC em um modelo de ABPA, com um inóculo de 7×10^7 conídios, considerado de severidade branda (LILLY et al., 2014). Em contrapartida, em um modelo de aspergilose invasiva (AI), Cenci e colaboradores (1999) mostraram que camundongos deficientes em IL-4, uma citocina característica de resposta Th2, foram mais resistentes a AI em comparação aos animais selvagens. A resistência foi associada ao impedimento da resposta Th2, incluindo a eosinofilia pulmonar, que culminou na diminuição das lesões histopatológicas do pulmão (CENCI et al., 1999). Nesse contexto, neste trabalho não foi verificadas alterações no recrutamento de eosinófilos, e nem em seu acúmulo nos pulmões, indicando que este tipo celular não é afetado pela exposição crônica ao etanol.

Em relação aos linfócitos, no presente estudo, observou-se que os animais tratados com etanol não apresentaram aumento na quantidade de linfócitos recrutados para os espaços alveolares, enquanto os animais controle que beberam água tiveram níveis elevados dessas células. Alguns estudos têm mostrado a importância da participação de linfócitos em infecções fúngicas (CURBELO; GALVÁN; ASPA, 2014). Na infecção pulmonar por *Cryptococcus neoformans*, foi demonstrado que a inflamação é gradualmente resolvida

por mecanismos dependentes das células T. Assim, a depleção de células T provocou um menor recrutamento de macrófagos e granulócitos e consequente falha para combater o patógeno (PIEHLER et al., 2011). Um outro tipo de estudo demonstrou que a produção da citocina IL-17 pelas células T CD4⁺, após a infecção pelo fungo *A. fumigatus*, é prejudicada nos animais alcoolistas, enquanto os animais controle aumentaram significativamente os níveis dessa citocina após um dia de infecção. As células produtoras de IL-17 são consideradas essenciais para a defesa antifúngica, e fungos são particularmente potentes indutores de resposta Th17 (KOYASU; MORO, 2012). Além disso, um modelo de consumo crônico de etanol seguido de infecção cutânea por *Staphylococcus aureus*, demonstrou que os camundongos tratados com etanol apresentaram maiores quantidades de lesões cutâneas, maior perda de peso e elevada bacteremia em comparação com os animais controle. O mecanismo subjacente à falha na migração de neutrófilos para o local da lesão e, conseqüentemente, o controle da infecção, foi devido à redução da produção de IL-1 β e IL-17, sugerindo que a resposta neutrofílica mediada por linfócitos Th17 está prejudicada nos camundongos que consumiram etanol (PARLET et al., 2015).

Um outro tipo celular avaliado foram as células T *natural killer* (NKT). De maneira interessante, os animais alcoolistas revelaram quantidades elevadas de células NKT após o tratamento, seguido de retorno aos níveis basais após infecção. As células NKT são uma população única de células T que expressam NK1.1, o receptor de células NK, sendo, portanto, chamadas de células NKT. Essas células desempenham papéis imunorreguladores importantes em diferentes tipos de respostas imunes. Em um trabalho recente, Zhang e colaboradores demonstraram que o consumo crônico de álcool aumenta a maturação e ativação das células NKT no fígado e no timo. Essas células ainda apresentaram uma grande produção de IFN- γ , citocina dominante no perfil de resposta imune Th1. No entanto, o mecanismo exato e a significância biológica do efeito do consumo de álcool sobre as células NKT ainda precisam ser elucidados (ZHANG et al., 2015). Na comparação das células positivas para CD8, o grupo tratado com etanol apresentou redução na quantidade de células TCD8⁺. Embora a redução não seja significativa. Em um modelo de criptococose pulmonar, Huffnagle e colaboradores (1994) mostraram, usando camundongos deficientes em células T CD4⁺ ou células T CD8⁺, que apesar das células T CD4 apresentarem um papel dominante no recrutamento de macrófagos e granulócitos para o pulmão, as células T CD8 também medeiam o recrutamento celular e contribuem para a secreção local de INF- γ .

Além do perfil de células presentes no foco infeccioso, lesão inflamatória e carga fúngica, foi avaliado se as diferenças na resposta inflamatória envolvendo o recrutamento de neutrófilos, observada nos animais que consumiram etanol, poderia estar associada com

alterações na produção de mediadores quimiotáticos para essa célula após a infecção. O consumo crônico de etanol não alterou a concentração do fragmento do complemento C5a e nem da citocina pró-inflamatória TNF- α . O sistema do complemento é um importante mecanismo de defesa da resposta imune inata. A ativação do sistema do complemento resulta na liberação de várias proteínas solúveis, dentre as quais se encontra o produto da clivagem do quinto componente, C5a. O fragmento C5a do complemento é um potente quimiotático para o recrutamento de neutrófilos e outros leucócitos (IVEY et al., 1995). O *A. fumigatus* ativa as três vias do complemento – clássica, alternativa e via da lectina (MARGALIT; KAVANAGH, 2015). Em um modelo de infecção pelo fungo *Candida albicans*, Zipfel e Skerka (2012) mostraram que o fragmento C5a, que é formado em resposta à infecção, induz a liberação celular das citocinas inflamatórias IL-6 e IL-1 β (ZIPFEL; SKERKA, 2012). O TNF- α é também um dos principais mediadores da resposta inflamatória aguda. É produzido por fagócitos mononucleares ativados, NK e mastócitos em resposta a antígenos microbianos e estimulam neutrófilos e monócitos a migrarem para o sítio de infecção (ROACH et al., 2002). Além disso, a sinalização pelo receptor de TNF- α (TNFR1) é essencial no controle da infecção por *Legionella pneumophila*. Os macrófagos alveolares dependem do TNF- α derivado de neutrófilos e monócitos para a sinalização através de TNFR1 para restringir a replicação bacteriana, e esse mecanismo é dependente da fagocitose de *L. pneumophila* (ZILTENER; REINHECKEL; OXENIUS, 2016).

Por outro lado, apesar da produção de C5a e TNF- α não estarem alteradas, a expressão da citocina IL-1 β , foi reduzida nos animais que consumiram etanol. Entre os vários mediadores inflamatórios, a citocina IL-1 β tem demonstrado grande importância na indução de processos inflamatórios causados por infecções (BALS; HIEMSTRA, 2004). Durante a invasão tecidual por *C. albicans*, o epitélio reconhece as PAMPs presentes nas hifas e se ativa, induzindo uma resposta pró-inflamatória contra o dano, caracterizado pela liberação, dentre outras citocinas, de IL-1 β e, consequente ativação do inflamassoma (MAYER; WILSON; HUBE, 2013; MOYES et al., 2012). Os inflamassomas são um grupo de complexos proteicos intracelulares que reconhecem diversos estímulos indutores de inflamação (como sinais microbianos, de estresse e de dano celular) e que controlam a produção de importantes citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e IL-18. Um dos inflamassomas mais bem estudados é o NLRP3, que possui capacidade de reconhecer diversos estímulos derivados de patógenos (SCHRODER; TSCHOPP, 2010). Por outro lado, outros estudos mostram que o consumo excessivo de álcool induz a maior secreção de IL-1 β e IL-18 e, consequentemente, ativação do inflamassoma. Essas observações foram feitas tanto em casos de lesões hepáticas (DESANTIS et al., 2013) e estudos de neuroinflamação (DE FILIPPIS et al., 2016; LIPPAI et al., 2013). Sendo assim, os resultados

encontrados neste trabalho, indicam que a deficiência na produção da citocina IL-1 β pelos animais tratados com etanol poderia estar associada com uma resposta imune menos eficiente no início da infecção, em comparação aos animais controle, acarretando na presença de carga fúngica elevada e maior susceptibilidade do hospedeiro.

Além disso, após dois dias de infecção, a concentração da citocina IL-10 no BAL dos animais controle é aumentada, enquanto nos animais que consumiram etanol cronicamente os níveis são basais. A IL-10 faz parte de um grande programa de resolução da resposta inflamatória, e suas principais funções incluem o bloqueio do recrutamento de células adicionais para o sítio de infecção e colaboram para a apoptose de leucócitos inflamatórios (BASIL; LEVY, 2016). A citocina IL-10 tem sido descrita com uma das mais importantes na supressão de produção de citocinas pró-inflamatórias induzidas por TLR4. Sua atividade repressora ocorre não somente pela inibição direta de transcrição gênica, mas também pela desestabilização de mRNA ou pelo bloqueio do processo de tradução (SABAT et al., 2010). Tomados em conjunto, esses resultados sugerem que a presença de lesão grave no tecido pulmonar dos animais alcoolistas, após dois dias de infecção, pode ter sido causada pela falha em combater o fungo ou pela expressão reduzida de IL-10, que culminou na falha da remoção das células inflamatórias nos pulmões.

Outros mediadores quimiotáticos avaliados foram as quimiocinas. As quimiocinas CXCL1 e CXCL2 (CXCL8 em humanos) são moléculas positivamente carregadas, que estão imobilizadas no endotélio por ligações a componentes negativamente carregados, que servem de âncoras para evitar que a força de cisalhamento as arrastem. Dessa forma, há a formação de um gradiente quimiotático. O sinal dessas quimiocinas via o seu receptor CXCR2 tem um papel crucial, porém não exclusivo, na ativação de neutrófilos e subsequente promoção da adesão ao endotélio no processo de migração celular (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013). Na resposta inflamatória, após o rolamento das células do sistema imune, que é mediado pela interação das P- e E -selectinas (no endotélio) e L-selectina (nos leucócitos) com seus respectivos receptores, há a adesão firme das células ao endotélio, que é mediada pela ligação de alta afinidade de integrinas nos leucócitos com as moléculas de adesão nos vasos. Neste trabalho, o que foi observado é que tanto na análise de rolamento quanto de adesão de leucócitos, os camundongos tratados cronicamente com etanol apresentaram deficiência em controlar o curso normal de migração celular, mostrando que a falha no influxo de neutrófilos está relacionada com menor adesão e rolamento das células. Na análise de expressão de moléculas de superfície em células circulantes, não foi observado diferença na expressão de L-selectina pelos neutrófilos dos grupos de animais infectados (células Ly6G⁺CD62L⁺). Por outro lado, verificou-se que os animais alcoolistas tiveram redução na expressão de CD11b (células Ly6G⁺CD11b⁺). CD11b

é um membro da família de integrinas que se parecia com CD18 para formar o heterodímero CR3 sendo expresso em monócitos, neutrófilos, células NK e macrófagos (KAWAI et al., 2005). Na dosagem das quimiocinas no sítio da infecção, não foi observado diferença na produção de CXCL1 nos dois grupos experimentais. No entanto, os níveis da quimiocina CXCL2 eram maiores nos animais que consumiram etanol após um dia de infecção. Nesse contexto, esse aumento na expressão de CXCL2 pode estar relacionado a uma tentativa frustrada do organismo do indivíduo alcoólico para tentar reverter a falha na migração de neutrófilos, que aconteceu tanto nos espaços alveolares quanto no parênquima pulmonar. Na literatura, é bem estabelecido que a diminuição da expressão ou a inibição do receptor de quimiocinas CXCR2 causa falha na migração de neutrófilos para as vias aéreas (CACALANO et al., 1994), principalmente em casos de sepse severa (LEY et al., 2007; RIOS-SANTOS et al., 2007). Além disso, a resposta à sepse severa é caracterizada por uma cadeia de eventos complexos, que envolvem inflamação sistêmica inapropriada - grande liberação de vários mediadores pró- e anti-inflamatórios na corrente sanguínea -, imunidade humoral e celular (PIERRAKOS; VINCENT, 2010). Considerando a liberação de mediadores no sangue, nos animais tratados com etanol, foi verificada uma grande quantidade de CXCL1 no soro, indicando que o impedimento na migração de neutrófilos pode ser semelhante ao que acontece nos casos de sepse severa. Alves-Filho e colaboradores (2009) observaram que durante a sepse severa a expressão reduzida de CXCR2 em neutrófilos circulantes é correlacionada com a falha da migração para o local da infecção, o desenvolvimento de inflamação sistêmica e alta mortalidade dos hospedeiros (ALVES-FILHO et al., 2009). O mecanismo proposto pelo qual acontece a regulação negativa do receptor é pelos mecanismos regulatórios de dessensibilização e internalização desses receptores quando se tem altas concentrações de quimiocinas no soro. Os receptores CXC são membros da família de receptores acoplados à proteína G (GPCR), e GRKs são proteínas quinase com resíduos de serina/treonina que regulam a internalização do receptor de quase todas as famílias de GPCR, incluindo os receptores de quimiocinas CXCRs e CCRs (MÉTAYÉ et al., 2005). Nesse sentido, também foi observado nesse trabalho, que os animais que consumiram etanol tiveram grande redução da expressão desse receptor nos neutrófilos circulantes do sangue.

De um modo geral, o que foi observado neste estudo é que a exposição crônica ao etanol foi relacionada com a diminuição da quantidade de células presentes no infiltrado inflamatório e o desbalanço na produção de citocinas pró- e anti-inflamatórias, que culminou em uma carga fúngica elevada e maior susceptibilidade dos animais à infecção.

Neste sentido, na ilustração 5, observa-se um modelo que descreve os mecanismos relacionados aos principais achados deste trabalho.

Durante infecções fúngicas pulmonares (*A. fumigatus*), a presença de conídios induz a ativação da resposta imune pró-inflamatória pelos macrófagos alveolares e recrutamento de neutrófilos que realizam eficientemente o *clearance* fúngico. No entanto, em indivíduos alcoolistas, é observado um grande aumento das concentrações circulantes de CXCL1/KC que culminam em uma maior internalização de receptores CXCR2. Os neutrófilos circulantes, apresentando menor densidade de receptores CXCR2 sofrem um efeito quimiotático menos acentuado, resultando em menores taxa de rolamento e adesão. Estes efeitos resultam em falha na migração neutrofílica para o sítio da infecção. Associado a estes eventos, há também uma deficiência na manutenção de uma resposta Th17 efetiva. Em conjunto, estas alterações permitem a colonização fúngica do pulmão, exacerbação das lesões e aumento da suscetibilidade de alcoolistas à infecção.

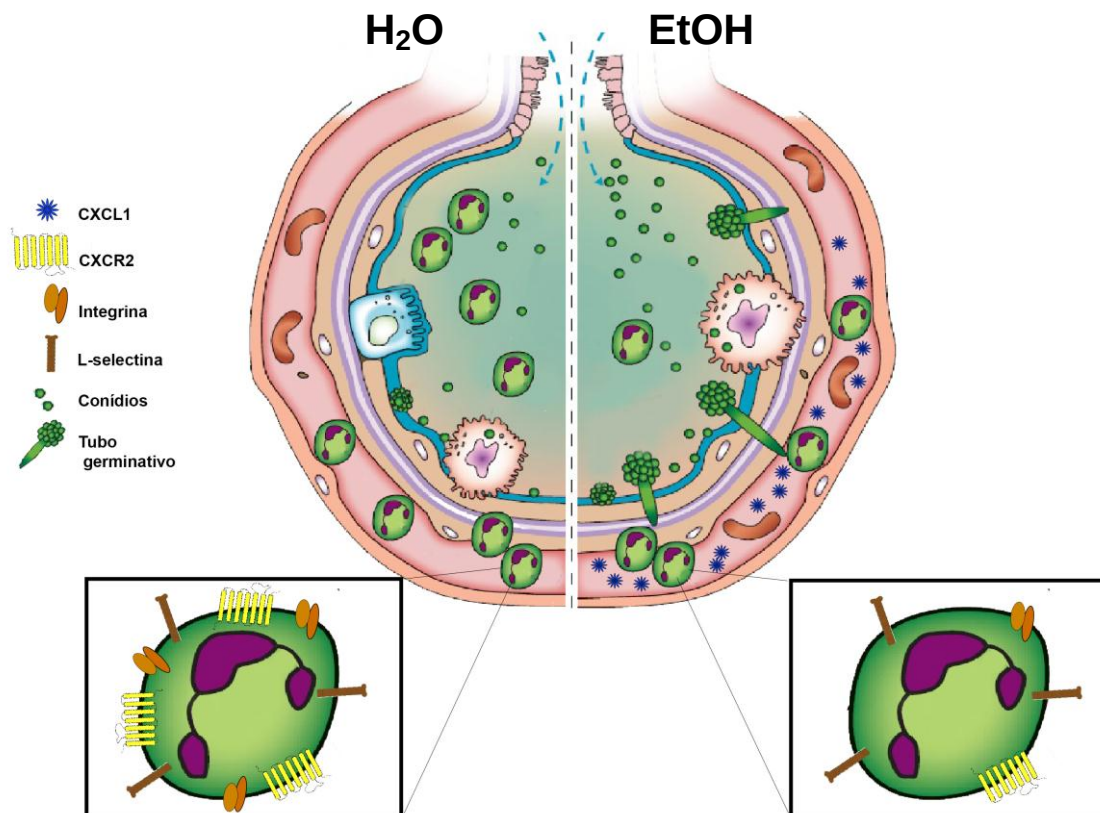


Ilustração 5. Mecanismo relacionados à falha de migração de neutrófilos para os alvéolos nos animais alcoolistas. Durante infecção por *A. fumigatus* em indivíduos alcoolistas, há uma falha na migração neutrofílica para os alvéolos que é relacionada ao aumento dos níveis de CXCL1/KC circulantes e ativação destas células pela diminuição da expressão de CXCR2. Fonte: adaptado de Vinh, DC, 2011.

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho nos permitem concluir que o consumo crônico de etanol afeta de maneira importante a suscetibilidade de animais consumistas à infecção pelo fungo *Aspergillus fumigatus*. A exposição crônica ao álcool altera os processos de transmigração celular e quimiotaxia de neutrófilos associados a deficiência no rolamento e adesão, aumento dos níveis circulantes de CXCL1/KC e à menor expressão de CXCR2 nestas células. Estas alterações associadas a uma menor ativação de resposta Th17 geram um ambiente propício à proliferação fúngica e aumento da letalidade após infecção.

8 REFERÊNCIAS

- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (5th ed.). Washington DC. 2013. *Disponível em:* <http://dx.doi.org/10.1176/appi.books.9780890425596>
- ADROVER, J. M.; NICOLÁS-ÁVILA, J. A.; HIDALGO, A. Aging: A Temporal Dimension for Neutrophils. **Trend Immunol**, v. xx, p. 1–12, 2016.
- AL-ABDALLAT, I. M. et al. The prevalence of alcohol and psychotropic drugs in fatalities of road-traffic accidents in Jordan during 2008-2014. **J For Leg Medic**, v. 39, p. 130–134, 2016.
- ALVES-FILHO, J. C. et al. Regulation of chemokine receptor by Toll-like receptor 2 is critical to neutrophil migration and resistance to polymicrobial sepsis. **PNAS**, v. 106, n. 10, p. 4018–23, 2009.
- BABOR, T. F. Alcohol: No ordinary commodity - A summary of the second edition. **Addiction**, v. 105, n. 5, p. 769–779, 2010.
- BALLOY, V.; CHIGNARD, M. The innate immune response to *Aspergillus fumigatus*. **Microb and Infec**, v. 11, n. 12, p. 919–927, 2009.
- BALS, R.; HIEMSTRA, P. S. Innate immunity in the lung: How epithelial cells fight against respiratory pathogens. **Europ Resp J**, v. 23, n. 2, p. 327–333, 2004.
- BASIL, M. C.; LEVY, B. D. Specialized pro-resolving mediators: endogenous regulators of infection and inflammation. **Nat Rev Immunol**, v. 16, n. 1, p. 51–67, 2016.
- BARCELOS, L. S.; TALVANI, A.; TEIXEIRA, A. S.; et al. **2005**. Impaired inflammatory angiogenesis, but not leukocyte influx, in mice lacking TNFR1. **J Leukoc Biol** 78: 352-8.
- BHATTY, M. et al. Role of acute ethanol exposure and TLR4 in early events of sepsis in a mouse model. **Alcohol**, v. 45, n. 8, p. 795–803, 2011.
- BIANCHI, V. et al. A comparison between serum carbohydrate-deficient transferrin and hair ethyl glucuronide in detecting chronic alcohol consumption in routine. **Alcohol and Alcohol.**, v. 50, n. 3, p. 266–270, 2014.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analyt Biochem**, v. 72, n. 1-2, p. 248–254, 1976.
- BRUNE, K. et al. Pulmonary epithelial barrier function- some new players and mechanisms. **A J Physiol. Lung Cel and Mol Physiol**, p. ajplung.00309.2014, 2015.
- CACALANO, G. et al. Neutrophil and B cell expansion in mice that lack the murine IL-8 receptor homolog. **Science** (New York, N.Y.), v. 265, n. 5172, p. 682–4, 1994.
- CENCI, E. et al. Interleukin-4 causes susceptibility to invasive pulmonary aspergillosis

through suppression of protective type I responses. **J of Inf Disease**, v. 180, n. 6, p. 1957–68, 1999.

CURBELO, J.; GALVÁN, J. M.; ASPA, J. Updates on Aspergillus, Pneumocystis and other opportunistic pulmonary mycoses. **Arch Bronconeumol**, n. xx, 2014.

CHAI, L. Y. A. et al. Aspergillus fumigatus cell wall components differentially modulate host TLR2 and TLR4 responses. **Microb and Infect**, v. 13, n. 2, p. 151–159, 2011.

COOK, R. T. Alcohol Abuse , Alcoholism , and Damage to the Immune System-A Review. v. 22, n. 9, p. 1927–1942, 1998.

COX, G. The role of neutrophils in inflammation. **Canad Respirat J**, v. 5, n. SUPPL. A, 1998.

DAGENAIS, T. R. T.; KELLER, N. P. Pathogenesis of Aspergillus fumigatus in invasive aspergillosis. **Clin Microbiol Rev**, v. 22, n. 3, p. 447–465, 2009.

DE FILIPPIS, L. et al. Ethanol-mediated activation of the NLRP3 inflammasome in iPS cells and iPS cells-derived neural progenitor cells. **Mol Brain**, v. 9, n. 1, p. 51, 2016.

DESANTIS, D. A. et al. Alcohol-induced liver injury is modulated by Nlrp3 and Nlrc4 inflammasomes in mice. **Mediat of Inflamm**, v. 2013, 2013.

EL-GUINDY, N. B. D. S.; VILLIERS, W. J. DE; DOHERTY, D. E. Acute alcohol intake impairs lung inflammation by changing pro- and anti-inflammatory mediator balance. v. 41, p. 335–345, 2007.

ENG, S. S.; DEFELICE, M. L. The Role and Immunobiology of Eosinophils in the Respiratory System: a Comprehensive Review. **Clin Rev in Allergy & Immunol**, p. 140–158, 2016.

ERWIG, L. P.; GOW, N. A. R. Interactions of fungal pathogens with phagocytes. **Nat Rev Microbiol**, v. 14, n. 3, p. 163–176, 2016.

GALDURÓZ, J. C. F.; CAETANO, R. [Epidemiology of alcohol use in Brazil]. **Rev brasileira de psiquiatria (São Paulo, Brazil : 1999)**, v. 26 Suppl 1, n. Supl I, p. S3–6, 2004.

GILMORE, W. et al. Alcohol: taking a population perspective. **Nat Rev Gastroenterol and Hepatol**, 2016.

GONZAGA, N. A. et al. Ethanol withdrawal increases oxidative stress and reduces nitric oxide bioavailability in the vasculature of rats. **Alcohol**, v. 49, n. 1, p. 47–56, 2015.

IVEY, C. L. et al. Neutrophil chemoattractants generated in two phases during reperfusion of ischemic myocardium in the rabbit: Evidence for a role for C5a and interleukin-8. **J of Clin Invest**, v. 95, n. 6, p. 2720–2728, 1995.

KAPHALIA, L.; CALHOUN, W. J. Alcoholic lung injury: Metabolic, biochemical and immunological aspects. **Toxicol Let**, v. 222, n. 2, p. 171–179, 2013.

KARAVITIS, J. et al. **NIH Public Access**. v. 274, p. 61–71, 2013.

KAWAI, K. et al. CD11b-mediated migratory property of peripheral blood B cells. **J of Allergy and Clin Immunol**, v. 116, n. 1, p. 192–197, 2005.

KLEBANOFF, S. J. Myeloperoxidase : friend and foe. **J of Leuk Biol**, v. 77, p. 598–625, 2005.

KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nat Rev Immunol**, v. 13, n. 3, p. 159–75, 2013.

KOOP, D. R. Alcohol metabolism's damaging effects on the cell. **Alcohol Res & Heal**, v. 29, p. 274–280, 2006.

KOYASU, S.; MORO, K. Role of innate lymphocytes in infection and inflammation. **Front in Immunol**, v. 3, n. MAY, p. 1–13, 2012.

KWON-CHUNG, K. J.; SUGUI, J. A. *Aspergillus fumigatus*-What Makes the Species a Ubiquitous Human Fungal Pathogen? **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 12, p. 1–4, 2013.

HOHL, T. M.; FELDMESSER, M. *Aspergillus fumigatus*: Principles of pathogenesis and host defense. **Eukaryotic Cell**, v. 6, n. 11, p. 1953–1963, 2007.

HUANG, J. et al. Methods for measuring myeloperoxidase activity toward assessing inhibitor efficacy in living systems. **J of Leuk Biol**, v. 99, n. 4, p. 541–548, 2016.

HUBBS, A. F. et al. Acute lung injury induced by a commercial leather conditioner. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 143, n. 1, p. 37–46, 1997.

JIE, H. et al. Necrostatin-1 enhances the resolution of inflammation by specifically inducing neutrophil apoptosis. v. 7, n. 15, 2016.

LATGÉ, J. P. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. **Clin Microbiol Rev**, v. 12, n. 2, p. 310–350, 1999.

LATGÉ, J. P. The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. **Trends in Microbiol**, v. 9, n. 8, p. 382–389, 2001.

LEE, Y. S. et al. Interleukin-1 (IL-1) signaling in intestinal stromal cells controls KC/ CXCL1 secretion, which correlates with recruitment of IL-22- secreting neutrophils at early stages of *Citrobacter rodentium* infection. **Infect and Immunity**, v. 83, n. 8, p. 3257–3267, 2015.

LEY, K. et al. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. **Nat Rev Immunol**, v. 7, n. 9, p. 678–89, 2007.

LIEBER, C. S. Metabolism of alcohol. **Clinics in Liver Dis**, v. 9, n. 1, p. 1–35, 2005.

LILLY, L. M. et al. Eosinophil deficiency compromises lung defense against *Aspergillus fumigatus*. **Infect and Immunity**, v. 82, n. 3, p. 1315–1325, 2014.

LIPPAI, D. et al. Alcohol-induced IL-1 β in the brain is mediated by NLRP3/ASC inflammasome activation that amplifies neuroinflammation. **J of Leuk Biol**, v. 94, n. 1, p. 171–82, 2013.

LUONG, T. T. et al. Ethanol-induced alcohol dehydrogenase E (AdhE) potentiates pneumolysin in *Streptococcus pneumoniae*. **Infect and Immunity**, v. 83, n. 1, p. 108–119, 2015.

MANZO-AVALOS, S.; SAAVEDRA-MOLINA, A. Cellular and mitochondrial effects of alcohol consumption. **Internat J of Environment Res and Public Health**, v. 7, n. 12, p. 4281–4304, 2010.

MARGALIT, A.; KAVANAGH, K. The innate immune response to *Aspergillus fumigatus* at the alveolar surface. **FEMS Microbiol Rev**, v. 39, n. 5, p. 670–687, 2015.

MARQUES, P. E. et al. Chemokines and mitochondrial products activate neutrophils to amplify organ injury during mouse acute liver failure. **Hepatol**, v. 56, n. 5, p. 1971–1982, 2012.

MAYER, F. L.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 119–28, 2013.

MEDEIROS, A. I. et al. Leukotrienes are potent adjuvant during fungal infection: effects on memory T cells. **J of Immunol**, v. 181, n. 12, p. 8544–51, 2008.

MEHTA, A. J. Alcoholism and critical illness: A review. **World J of Crit Car Med**, v. 5, n. 1, p. 27–35, 2016.

MEHRAD, B.; STANDIFORD, T. J. Use of Animal Models in the Study of Inflammatory Mediators of Pneumonia. **ILAR J/Nat Res Council, Inst of Laborat Animal Resources**, v. 40, n. 4, p. 167–174, 1999.

MELONI, J. N.; LARANJEIRA, R. Custo social e de saúde do consumo do álcool. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 26, n. SUPPL., p. 7–10, 2004.

MESSINGHAM, K. A. N.; FAUNCE, D. E.; KOVACS, E. J. Alcohol, injury, and cellular immunity. **Alcohol**, v. 28, n. 3, p. 137–149, 2002.

MÉTAYÉ, T. et al. Pathophysiological roles of G-protein-coupled receptor kinases. **Cell Signal**, v. 17, n. 8, p. 917–928, 2005.

MEYERHOLZ, D. K. et al. Chronic alcohol consumption increases the severity of murine influenza virus infections. **J of Immunol**, v. 181, n. 1, p. 641–8, 2008.

MOLINA, P. E. et al. Focus on: Alcohol and the immune system. **Alcohol Res & Health : J of the Nat Inst on Alcohol Abuse and Alcohol.**, v. 33, n. 1-2, p. 97–108, 2010.

MOYES, D. L. et al. Activation of MAPK/c-Fos induced responses in oral epithelial cells is specific to *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* hyphae. **Med Microbiol and Immunol**, v. 201, n. 1, p. 93–101, 2012.

NUNES-SILVA, A. et al. Treadmill exercise induces neutrophil recruitment into muscle tissue in a reactive oxygen species-dependent manner. An intravital microscopy study. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, 2014.

OHAMA, H. et al. M2b macrophage elimination and improved resistance of mice with chronic alcohol consumption to opportunistic infections. **Am J of Pathol**, v. 185, n. 2, p. 420–431, 2014.

OLIVEIRA, M. C. et al. Acute and sustained inflammation and metabolic dysfunction induced by high refined carbohydrate-containing diet in mice. **Obesity**, v. 21, n. 9, p. 396–406, 2013.

SCHILTER, H. C. et al. Effects of an anti-inflammatory VAP-1/SSAO inhibitor, PXS-4728A, on pulmonary neutrophil migration. **Respir Res**, v. 16, p. 42, 2015.

PARLET, C. P. et al. Chronic ethanol feeding increases the severity of *Staphylococcus aureus* skin infections by altering local host defenses. **J of Leuk Biol**, v. 97, n. 4, p. 769–778, 2015.

PEREZ-NADALES, E. et al. Fungal model systems and the elucidation of pathogenicity determinants. **Fung Gen and Biol**, v. 70, p. 42–67, 2014.

PIEHLER, D. et al. Eosinophils contribute to IL-4 production and shape the T-helper cytokine profile and inflammatory response in pulmonary cryptococcosis. **Am J of Pathol**, v. 179, n. 2, p. 733–744, 2011.

PIERRAKOS, C.; VINCENT, J.-L. Sepsis biomarkers: a review. **Crit Car**, v. 14, n. 1, p. R15, 2010.

REINER, R. G. et al. A comparative study of lysosomal enzyme activity in monocytes and Kupffer cells isolated simultaneously in a rat model of liver injury. **Clin and Exper Immunol**, v. 43, n. 2, p. 376–380, 1981.

RIOS-SANTOS, F. et al. Down-regulation of CXCR2 on neutrophils in severe sepsis is mediated by inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide. **Am J of Res and Crit Car Med**, v. 175, n. 5, p. 490–497, 2007.

ROACH, D. R. et al. TNF Regulates Chemokine Induction Essential for Cell Recruitment, Granuloma Formation, and Clearance of Mycobacterial Infection. **J of Immunol**, v. 168, n. 9, p. 4620–4627, 2002.

ROTH FLACH, R. J.; CZECH, M. P. NETs and traps delay wound healing in diabetes. **Trend in Endocrinol and Metabol**, v. 26, n. 9, p. 451–452, 2015.

SABAT, R. et al. Biology of interleukin-10. **Cytokine & growth Factor Rev**, v. 21, n. 5, p. 331–44, 1 out. 2010.

SCHILTER, H. C. et al. Effects of an anti-inflammatory VAP-1/SSAO inhibitor, PXS-4728A, on pulmonary neutrophil migration. **Respir Res**, v. 16, p. 42, 2015.

SCHRODER, K.; TSCHOPP, J. The Inflammasomes. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 821–832, 2010.

SIMET, S. M.; SISSON, J. H. Alcohol's effects on lung health and immunity. **Alcohol Research: Current Rev**, v. 37, n. 2, p. 199–208, 2015.

SMITH, J. A.; KAUFFMAN, C. A. Pulmonary fungal infections. **Respirol**, v. 17, n. 6, p. 913–926, 2012.

SÔNEGO, F. et al. Paradoxical Roles of the Neutrophil in Sepsis: Protective and Deleterious. **Front in Immunol**, v. 7, n. April, p. 1–7, 2016.

SORIANI, F. M. et al. Functional characterization of the *Aspergillus fumigatus*. v. 67, n. February, p. 1274–1291, 2008.

SOUZA, D. G. et al. Effects of the PAF receptor antagonist UK74505 on local and remote reperfusion injuries following ischaemia of the superior mesenteric artery in the rat. **Brit J of Pharmacol**, v. 131, n. 8, p. 1800–1808, 2000.

STRATH, M.; WARREN, D. J.; SANDERSON, C. J. **1985**. Detection of eosinophils using an eosinophil peroxidase assay. Its use as an assay for eosinophil differentiation factors. **J Immunol Methods** 83(2): 209-15.

SZABO, G. et al. Alcohol ' s Effect on Host Defense. **Alcohol Res**, v. 37, n. 2, p. 159–170, 2015.

TAO, X. et al. Characterization and Demonstration of value of a Lethal Mouse Model of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Infection and Disease. **J of Virol**, n. October, p. 747–762, 2015.

TEKAIA, F.; LATGÉ, J. P. *Aspergillus fumigatus*: Saprophyte or pathogen? **Current Opinion in Microbiol**, v. 8, n. 4, p. 385–392, 2005.

THAKUR, R. et al. Cytokines induce effector T-helper cells during invasive aspergillosis; what we have learned about T-helper cells? **Front in Microbiol**, v. 6, n. MAY, p. 1–6, 2015a.

URSO T, Gavalier JS, Van Thiel DH. Blood ethanol levels in sober alcohol users seen in an emergency room. **Life Sci** 1981;28:1053-1056.

VALIANTE, V. et al. The *Aspergillus fumigatus* cell wall integrity signalling pathway: Drug target, compensatory pathways and virulence. **Front in Microbiol**, v. 6, n. MAR, p. 1–12, 2015.

WAGNER, J. G.; ROTH, R. A. Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. **Pharmacolog Rev**, v. 52, n. 3, p. 349–374, 2000.

WALSH, T. J. et al. Treatment of aspergillosis: Clinical practice guidelines of the infectious diseases society of America. **Clin Infect Dis**, v. 46, n. 3, p. 327–360, 2008.

YEH, M. Y. et al. Chronic alcoholism alters systemic and pulmonary glutathione redox status. **Am J of Resp and Crit Car Med**, v. 176, n. 3, p. 270–276, 2007.

YELIGAR, S. M. et al. Ethanol induces oxidative stress in alveolar macrophages via upregulation of NADPH oxidases. **J of immunol**, v. 188, n. 8, p. 3648–57, 2012.

YELIGAR, S. M. et al. Glutathione attenuates ethanol-induced alveolar macrophage oxidative stress and dysfunction by down-regulating NADPH oxidases. **Am J of Physiol. Lung Cel and Mol Physiol**, v. 4, p. 429–441, 2014.

ZEMANS, R. L.; COLGAN, S. P.; DOWNEY, G. P. Transepithelial migration of neutrophils: Mechanisms and implications for acute lung injury. **Am J of Resp Cell and Mol Biol**, v. 40, n. 5, p. 519–535, 2009.

- ZHANG, H. et al. Chronic alcohol consumption enhances iNKT cell maturation and activation. **Toxicol and Appl Pharmacol**, v. 282, n. 2, p. 139–150, 2015.
- ZHU, J.; YAMANE, H.; PAUL, W. Differentiation of effector CD4 T cell populations. **Annu Rev Immunol.**, v. 28, n. 1, p. 445–489, 2010.
- ZILTENER, P.; REINHECKEL, T.; OXENIUS, A. Neutrophil and Alveolar Macrophage-Mediated Innate Immune Control of Legionella pneumophila Lung Infection via TNF and ROS. **PLOS Pathogens**, v. 12, n. 4, p. e1005591, 2016.
- ZIPFEL, P. F.; SKERKA, C. Complement, Candida, and cytokines: The role of C5a in host response to fungi. **Europ J of Immunol**, v. 42, n. 4, p. 822–825, 2012.

9 ANEXOS

9.1 ANEXO I



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 4 / 2015, relativo ao projeto intitulado "Efeito do consumo crônico de álcool nas respostas imune e inflamatória em modelo de aspergilose pulmonar", que tem como responsável Frederico Marianetti Soriani, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 26/05/2015. Este certificado expira-se em 26/05/2020.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 4 / 2015, related to the Project entitled "Effect of chronic alcohol consumption in immune and inflammatory responses in a model of pulmonary aspergillosis.", under the supervision of Frederico Marianetti Soriani, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 26/05/2015. This certificates expires in 26/05/2020.

Cleuza Maria de Faria Rezende
Coordenador(a) da CEUA/UFMG
Belo Horizonte, 26/05/2015.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG
<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

9.2 ANEXO II - Trabalho científico 1

Title:

Characterization of a murine model of pulmonary aspergillosis. Insights into inflammatory parameters.

Authors:

Nathália Luísa Sousa de Oliveira Malacco¹; Aline Cecília Mendes², Milene Alvarenga Rachid³; Remo de Castro Russo⁴, Daniele da Glória de Souza⁵, Mauro Martins Teixeira²; Frederico Marianetti Soriani¹;

Affiliations:

1. Departamento de Biologia Geral, 2. Departamento de Bioquímica e Imunologia, 3. Departamento de Patologia, 4. Departamento de Fisiologia e Biofísica, 5. Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

Corresponding author:

Frederico Marianetti Soriani, Ph.D., Laboratório de Genética Funcional, Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Antônio Carlos, 6627, CEP 31270-901 – Pampulha, Belo Horizonte, MG, Brasil.

E-mail address: fredSORI@icb.ufmg.br

Telephone number: 55 31 3409-3009

Abstract

Pneumonia is a well-marked, acute or chronic infection, involving pathogen lung colonization and several grades of inflammatory response. Among the most common opportunistic pathogen, included as pneumonia etiological agent, *Aspergillus fumigatus*, after inhalation of airborne conidia, activate resident macrophages and induce a robust proinflammatory response. In this paper, we characterized an animal model of pulmonary aspergillosis and describe several biochemical, immunological and pathological parameters in the time-course of the infection. After infection of *A. fumigatus* wild type strain, mice show a inoculum dependent disease. Following up the course of the disease, lethality is accompanied by loss of body weight and intense inflammatory cell infiltrate to the airways and lung tissue. This cell infiltrate is mainly composed by neutrophils, responsible for fungal clearance. This huge inflammatory initial response remains while pathogen is still present. After 3-5 days post

infection, the resolution phase takes place with a shift in the cell profile infiltrate with the maintenance of higher levels of macrophages, responsible for healing. After 7 days post infection, histology and inflammation are restored and curiously, there is no fibrosis in lung tissue. Our model of pulmonary aspergillosis open an array of possibilities for the study of (i) fungal pulmonary infections with emphasis in the virulence determination of different fungal strains and isolates, (ii) inflammatory host response, (iii) drug target characterization, (iv) studies of co-infection, (v) studies of comorbidities and (vi) elucidation of inflammatory events like resolution process in infectious diseases.

Keywords: pneumonia, fungal infection, animal model of aspergillosis, lung inflammatory response.

Introduction

According to U.S. National Institute of Healthy, pneumonia caused almost 60,000 deaths in 2008, the seventh leading cause of death in USA and all over the world. Furthermore, approximately 20 billion dollars was spent in 2008 to afford pneumonia's costs of healthcare (\$ 14 billion) and lost productivity (\$ 6 billion)¹. Considering children, young and elderly populations (aged 1-24 and 65 or older), pneumonia and influenza together accounted nearly 25% of all lung disease deaths in the same year. From 1990 to 2008, respiratory disease was ranked as the third age-adjusted cause of death¹. In future, millions of people will still suffer and dying with lung disease, including asthma, chronic obstructive pulmonary disease (COPD), lung cancer, pulmonary fibrosis, sepsis and pneumonia².

Pneumonia is well marked as an acute or chronic illness induced by infection of the lower respiratory tract, involving the lung parenchyma with evident tissue inflammation. Inflammatory response triggered by viruses, bacterial and fungi, the most common etiological agents^{3,4}, generate several changes in microcirculation such as angiogenic phenomena, release of soluble molecules and accumulation of polymorphonuclear leukocytes (PMN), that are quickly recruited from the lung capillaries to alveoli and by adaptive elements, followed by monocytes/macrophages⁵. This process is critical to preserve tissue homeostasis and if not controlled becomes deleterious to the host, progressing to chronic inflammation, scarring and fibrosis³. Pneumonia development demands that pathogen grows in the lung parenchyma, achieves the alveoli, and host defenses are overwhelmed by the virulence or load of the microorganism, causing intra-alveolar exudate⁶. In bacterial *Streptococcus pneumoniae* bronchopneumonia, there is usually the occupation of alveolar spaces by inflammatory cells, exudate and fibrin. Inflammation initiates as a peribronchiolar

inflammation involving many lobes and diffuses to the contiguous parenchyma resulting in unequal nodules and consolidation⁴. Common complications after pulmonary infections includes necrosis, abscess and emphysema⁷.

Among several respiratory pathogens, fungi are responsible for nosocomial and community acquired pneumonias^{8,9}. One of the most important opportunistic fungal pulmonary infections includes the pathogen *Aspergillus* sp¹⁰. Among all species, *Aspergillus fumigatus*, a ubiquitous saprophytic fungus, is etiological agent responsible for approximately 90% of invasive aspergillosis diagnosed. *A. fumigatus* liberates airborne conidia which are inhaled by humans frequently^{11,12}. Following conidia inhalation, resting conidia begin to swell and become metabolically active, which leads fungal cell wall remodeling and trigger a proinflammatory immune response¹³. For immunocompetent individuals, inhaled conidia are swiftly cleared by cells of the pulmonary immune system^{10,13}. If innate immune system are not capable in to eliminate conidia, they can germinate and form invasive hyphae which might penetrate in lung tissue¹³. When the immune system is immunosuppressed, *A. fumigatus* exploits fragility in host defenses which can result in the development of aspergillosis^{13,14}. The recognition of conidia by alveolar macrophages and epithelial cells in immunocompetent hosts is essential to clearance of the pathogen. Moreover, the lines of defense are anatomical barriers on respiratory tract, such as mucociliary elevator, phagocytic cells, basically macrophages and neutrophils – and their related antimicrobial activity - and humoral factors, for example, complement¹¹. The innate immune response plays a main role against *A. fumigatus*. It accounts with specific phases and host components that are recruited to confront the different cellular forms of the fungus¹³. Alveolar macrophages act quickly in conidia phagocytosis and concomitantly secrete proinflammatory mediators that recruit neutrophils to the alveoli. Neutrophils have an essential role in fungal clearance and, unlike macrophages, are also able to eliminate germinating conidia, preventing hyphae growing¹⁰. In later stages of respiratory fungal infection, dendritic cells activate a protective *A. fumigatus*-specific adaptive immune response which is driven by T helper 1 (Th1) CD4⁺ T cells¹³.

Because of the possibility to examine complex biological processes, animal models are useful to help understand the physiopathology of pulmonary infections. Moreover, elucidate mechanisms of host and fungal pathogen interactions provide an exciting knowledge for discovering novel therapeutic targets, early diagnostic and drugs against these airborne human diseases.

Here, we characterize histological and immunological events in a model of non-neutropenic pulmonary aspergillosis. We show that after infection there is a huge inflammatory process, characterized by an elevated number of neutrophils, in acute phase and a resolution phase

of the infection, characterized by a clearance of neutrophils infiltration and an enhanced macrophage migration to the airways of infected mice, in a late phase, with restoration of immunological and histological parameters. These characteristics in this model of pulmonary infection allow the development of studies focused even in the set up though in the resolution of inflammatory processes. Moreover, every kind of host-pathogen interactions, including identification of virulence factors, could be assessed using this approach. We also demonstrate that this model can be used to analyze and characterize biological targets for drug development, aiming the pathogen or host immune system.

Materials and methods

Ethics statement

All animal experiments were approved by CETEA/UFMG animal ethics committee (Protocol number 62/2011), according to Brazilian national guidelines on animal work.

Fungus

Aspergillus fumigatus wild-type strain (CEA17-80) was used in this study¹⁵. Media used were: complete medium composed of 2% w/v glucose, 2% w/v agar, 0.5% w/v yeast extract and trace elements (YAG)¹⁶. Strains were grown at 37°C for 48 hours. Conidia were harvested by washing the media with 30 mL of sterile phosphate-buffered saline (PBS) and passed through a sterile 40 µm nylon membrane to remove hypha fragments. Then, conidia were diluted and counted in Neubauer chamber.

Animal infections

Male 10–12 weeks old C57BL/6J mice were maintained in pathogen free conditions at Laboratório de Imunofarmacologia (UFMG/Brasil). Prior to infection, mice were anesthetized by steaming up to 3% isoflurane (Biochimico, Brasil) with oxygen and then, were infected intranasally with 10⁸ or 3x10⁸ conidia of *A. fumigatus* in a total volume of 40 µL of sterile PBS. Infected mice (at least 5 mice per group) were euthanized 1, 3, 7, 14 and 21 days after infection and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and lungs were harvest.

Bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and tissue extraction

At indicated time points, infected mice were euthanized with a solution of 150 mg/kg of ketamine and 10 mg/kg of xylazine. Once death was confirmed, a 1.7 mm catheter was inserted into the trachea and lungs were washed twice with 1 mL of cold sterile PBS and BALF was performed. Recovery of BALF was approximately 90% per mouse. The samples

were centrifuged at 2,000 rpm for 10 minutes at 4°C and supernatants were frozen at -20°C. The cell pellets were resuspended in PBS, and total cell counts were determined by counting leukocytes in Neubauer chamber after staining with Turk's solution to evaluate the number of infiltrating leukocytes in alveolar space. Differential cell counts were obtained from cytospin preparations (Shandon III) by evaluating the percentage of each leukocyte on a slide stained with May-Grunwald-Giemsa¹⁷. Cells (200 per animal) were counted at a magnification of 100 x. After BALF and perfusion of lungs with 5 mL of cold sterile PBS in order to remove circulating blood, the right lobes were removed and frozen for subsequent analysis of myeloperoxidase (MPO), n-acetylglucosaminidase (NAG) and measurement of fungal burden. The left lobe was fixed in formalin 4% to histological analysis.

Quantification of neutrophil and macrophage accumulation in lung tissue by MPO and NAG activity measurement

The extent of neutrophil and macrophage accumulation in lung tissue was measured by assaying MPO and NAG activity, as previously described¹⁸. Briefly, tissue (0.1 g of tissue per 1.9 ml of buffer) was homogenized in a pH 4.7 buffer (0.1 M NaCl, 0.02 M Na₂PO₄, 0.015 M Na₂EDTA), centrifuged at 10,000 rpm for 10 minutes, and the pellet subjected to hypotonic lyses (1.5 ml of 0.2% NaCl solution followed by an addition 30 seconds later of an equal volume of a solution containing NaCl 1.5% and glucose 5%). After a further centrifugation, pellets were divided into two portions and suspended with different buffers specific for measurement MPO or NAG. In MPO the pellet was resuspended in 0.05 M Na₂PO₄ buffer (pH 5.4) containing 0.5% hexadecyl-trimethylammonium bromide (HTAB) and re-homogenized. One-milliliter aliquots of the suspension were transferred into 1.5 mL micro-tubes followed by three freeze-thaw cycles using liquid nitrogen. The aliquots were then centrifuged for 15 minutes at 10,000 rpm to perform the assay. In NAG, the pellet was resuspended in 2.0 mL cooled (4°C) 0.9% saline containing 0.1% v/v Triton X-100, vortex-homogenized, and centrifuged at 4°C for 10 min at 3,000 rpm. The supernatants were saved and used for NAG assay. If the NAG assay was not carried out immediately, the supernatants were kept frozen until used.

MPO and NAG assay reaction

The MPO assay reaction employed 25 µL of 3,3'-5,5'-tetramethylbenzidine (TMB; Sigma), dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO; Merck, Darmstadt, Germany) at a final concentration of 1.6 mM, 100 µL of H₂O₂, dissolved in phosphate buffer (pH 5.4) containing HTAB in a final concentration of 0.002% v/v and 25 µL of supernatant from tissue sample processed. The reaction was started at 37° C for 5 minutes in a 96-well microplate by adding the

supernatant and the TMB solution. After that, H₂O₂ was added and followed by a new incubation at 37° C for 5 minutes. The reaction was stopped by adding 100 μ L of 1M H₂SO₄ and quantified at 450 nm in a spectrophotometer (Emax; Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Neutrophil number in each sample was calculated from a standard curve of neutrophils obtained from the peritoneal cavity of 5% casein-treated animals and processed in the same way. The results were expressed as relative number of neutrophils per 100 mg of wet tissue¹⁸.

The NAG assay reaction was started at 37° C for 10 min in a 96-well microplate by the addition of 100 μ L of p-nitrophenyl-N-acetyl-D-glucosaminide (Sigma Chemical Co.), dissolved in citrate/phosphate buffer (0.1 M citric acid, 0.1 M Na₂HPO₄, pH 4.5) in a final concentration of 2.24 mM–100 μ L supernatant from tissue sample processing, dissolved in citrate/phosphate buffer at appropriate dilutions. The reaction was terminated by the addition of 100 μ L 0.2 M glycine buffer (pH 10.6) and was quantified at 405 nm in a spectrophotometer (Emax, Molecular Devices)

Measurement of total proteins and nitrite

Total protein quantification based on Bradford's method (Bio-Rad Protein Assay) was performed on BALF to measure protein leakage to airways. The reaction was started in a well-96 plate adding 40 μ L of reagent to 160 μ L of BALF sample and quantified at 595 nm in a spectrophotometer (Emax; Molecular Devices, Sunnyvale, CA). A standard curve of proteins concentrations against absorbance, with concentrations ranging from 5 to 30 μ g/mL was used to quantify the concentrations of proteins in the samples. The results were expressed in mg/mL. The measurement of nitrite (NO₂⁻) in BALF was performed by Griess reaction. Nitrite reacts under acidic conditions with sulfanilic acid (HO₃SC₆H₄NH₂) to form a diazonium cation (HO₃SC₆H₄-N $\equiv$ N⁺) which subsequently couples to the aromatic amine 1-naphthylamine (C₁₀H₇NH₂) to produce a red-violet coloured (λ ~ 540 nm)¹⁹. Briefly, 60 μ L of Griess reagent (1% sulfanilamide and 0.1% naphthylethylenediamine in 2.5% phosphoric acid) was added to 60 μ L of BALF samples. After 10 min, the absorbance of the samples was measured at 540 nm. A standard curve of nitrite concentrations against absorbance, with concentrations ranging from 5 to 240 μ M was used to quantify the concentrations of nitrite in the samples. The results were expressed in μ M.

Measurement of HO-proline

Fragments (100 mg) of lungs were removed for hydroxyproline determination, as an indirect measurement of collagen content²⁰. Briefly, tissues were homogenized in 0.2% saline, frozen, and lyophilized. The assay was performed with 20 mg of the lyophilized material

subjected to alkaline hydrolysis in 300 μ L of H₂O plus 75 μ L of 10M NaOH at 120° C for 20 minutes. An aliquot of 50 μ L of the hydrolyzed tissue was added to 450 μ L of Chloramine T oxidizing reagent (0.056 M Chloramine T and n-propanol 10% in acetate-citrate buffer [pH 6.5]) and allowed to react for 20 minutes. A hydroxyproline standard curve was prepared likewise. Color was developed by the addition of 500 μ L of 1 M p-dimethylaminebenzaldehyde diluted in n-propanol-perchloric acid (2:1 [v/v]). The absorbance was quantified at 550 nm in a spectrophotometer (Emax; Molecular Devices)¹⁸.

Histological analysis

Formalin-fixed left lobes of lungs were dehydrated gradually in ethanol, embedded in paraffin, cut into 4mm sections (3 sections per lung), stained with Hematoxylin and Eosin (H&E) or Grocott's methenamine silver (GMS). Samples stained with HE were examined under light microscopy by a pathologist blind to the experimental procedure. Lung was graded on a 0 to 5-point scale: 0 = no pathology; 1 = minimal tissue destruction and/or inflammation; 2 = mild tissue destruction and/or inflammation; 3 = moderate tissue destruction and/or inflammation; 4 = marked tissue destruction and/or inflammation and 5 = intense tissue destruction and/or inflammation.

Fungal burden

For lung fungal burden analysis, the right lungs were collected at specific times post exposure and homogenized in 1 mL of PBS, diluted and plated in YAG media. After incubation for 20 hours at 37° C, colonies forming units (CFU) were counted.

Statistical analysis

All data are presented as the mean $\pm$ SD and were analyzed using One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Newman-Keuls post-test to compare different groups. Unpaired t test was used to compare two groups. Statistical significance was set as $P < 0.05$ and all graphs and analysis were performed using Graph Pad Prism 5 software.

Results

Susceptibility and body weight change after *A. fumigatus* infection

To investigate the impact of *A. fumigatus* infection in C57Bl/6 mice lethality and body weight change were analyzed. Animals were intranasally infected with 108 or 3x108 conidia per mouse and survival and weight loss were monitored for 21 days after infection. In Figure 1A we show that the outcome of *A. fumigatus* infection is inoculum dependent. The group

infected with 108 conidia has lower lethality (25%) in comparison to 3x10⁸ conidia infected group (52.4%), at day 21 after infection. Following lethality, we also determined body weight change for these animals after *A. fumigatus* infection. Animal's weight is significantly lower from 1 to 6 days post infection compared to the control NI group (figure 1B) when infected with 108 conidia. In addition, mice that intranasally received 3x10⁸ *A. fumigatus* conidia undergo even more marked weight loss that was significantly higher from 4 to 10 days post infection (compared with 108 inoculum group). The greatest amount of weight loss was observed 1 day post infection in the 108 inoculum group (14.6%), whereas mice challenged with the 3x10⁸ inoculum lost only 4.7% of its weight on this day. The peak of its body weight loss is on the second day after infection (14.9%). Thereafter, mice gradually regained their body weight. These results suggest that the infectious process accessed by lethality and body weight is inoculum dependent.

Fungal clearance

In order to further understand the influence of the higher inoculum in susceptibility and loss of body weight, we determined *A. fumigatus* lung clearance. In this sense, we assessed, by culture of lung homogenates, the number of colony forming units (CFU) at 1 and 3 days post infection, period which the inflammatory response is more acute, regardless to the inoculum. We show in figure 2H that pulmonary fungal counts in both 108 or 3x10⁸ conidia infected mice, fungal load is raised at 1 day post *A. fumigatus* inoculation (4.36 ± 0.43 for 108 group and 22.83 ± 2.16 for 3x10⁸ group), and there is a statistically reduction of this burden at 3 days post infection (1.53 ± 0.36 for 108 group and 12.4 ± 5.38 for 3x10⁸ group). Moreover, we analyzed Grocott's methenamine silver (GMS) staining of lung tissues. GMS staining revealed wide presence of conidia by 1 day post infection (figure 2C and D) in comparison to the NI control group (figure 2A and B), followed by a reduction at 3 days after *A. fumigatus* inoculation (figure 3 E and F). In addition, figure 2G show conidial abundance in the 3x10⁸ inoculum group. Taken together these results indicate that the course of the host response in fungal removal is similar in both inocula and the host immune system is able to deal with infection in a proper manner at the initial phases of infection.

Histopathological analysis

Because previous results have shown a decrease in fungal load in animal's lungs from both inocula we next looked at the relationship between these profiles with the recruitment of leukocytes to the site of infection. During the coming analysis, we chose the less lethal inoculum to evaluate histological and cellular inflammatory parameters. The course of 108 *A. fumigatus* infection was analyzed by histological lung preparations to assess tissue damage

at 1, 3, 7, 14 and 21 days post infection. Our data show that the mice response to *A. fumigatus* infection is characterized by mild and focal leukocyte recruitment in lungs at 1 day post infection (figure 3C and D), compared to the NI group (figure 3A and B). This cellular infiltrate become pronounced after 3 days of infection, occupying more than 50% of the pulmonary structure, including the alveoli and perivascular regions (figure 3E and F). After 7 days of *A. fumigatus* infection, the amount of cellular infiltrate is sparser, demonstrating that infection has started the resolution phase (figure 3G and H). After 14 days of infection, histopathological findings are almost imperceptible (figure 3I and J). In 21 days post infection, histological images are similar to mock group (data not shown).

In addition, in figure 4A we quantified the infiltrate parameters observed in histological slides. The lesions severity and distribution caused by inflammation was quantified in an inflammatory score. Mice lungs of *A. fumigatus* infection displayed variable degrees of inflammatory lesions characterized by a higher vascular permeability accompanied with cellular infiltrates, mainly located around blood vessels and bronchia/bronchiole in the early time points analyzed. Lungs from groups with higher pathology score (3 days post infection) exhibited multifocal to coalescing necro-inflammatory areas. Several alveoli and bronchia/bronchioli were filled with neutrophils, macrophages and lymphocytes (broncopneumonia). Furthermore, we evaluate vascular permeability by assessing plasmatic proteins extravasation at the indicated time points. We found that mice with 3 days of *A. fumigatus* infection had increase of vascular permeability (figure 4B). Curiously, in figure 4C we demonstrate that all this infectious and inflammatory processes caused by *A. fumigatus* did not cause fibrosis in the lung tissue, measured by hydroxyproline levels. Moreover, nitric oxide, found to play essential role in host defense against intracellular pathogens²¹, was measured by nitrite production and our results show, in figure 4D, that is not affected by *A. fumigatus* infection.

Pattern of inflammatory cells in alveoli and lung tissue

In order to investigate cellular infiltration to airways after *A. fumigatus* infection, we analyzed BALFs and lungs. Inflammatory cell transmigration is a complex process that requires inflammatory signals as chemotaxis²². In the course of circulating cell transmigration process, inflammatory cells go from vessels to the infection site, passing through tissue matrix²³. In this way, we assessed cell infiltration analyzing inflammatory and immune cells in the airways (BALFs) and indirectly, cell accumulation in lung tissue, by biochemical markers. To examine the course of cell infiltrate into airways, we analyzed animals after 1, 3, 7, 14 and 21 days after inhalation of *A. fumigatus*. After 1 day of infection, data show (figure 5A) higher levels of neutrophils in airways ($1.05 \times 10^6 \pm 0.24$) reaching a

peak in the third day (1.94 ± 0.28). In the same way, eosinophils, that represent important cells during filamentous fungi infection, especially during allergic reactions triggered by mold, have their levels augmented after 1 and 3 days post infection ($1.15 \times 10^4 \pm 0.5$ for 1dpi and 2.5 ± 0.14 for 3 dpi), prolonging these levels until day 7 (1.35 ± 0.37), as we show in figure 5B. After these time points, resolution of infection takes place and neutrophil and eosinophil cell infiltrate return to basal levels (neutrophils: 0.03 ± 0.025 for 7 dpi; 0.03 ± 0.016 for 14 dpi; and 0.01 ± 0.02 for 21 dpi; eosinophils: 0.17 ± 0.35 for 14 dpi and 0.03 ± 0.06 for 21 dpi). All these results corroborate our findings in the lung tissue with indirectly determination of the inflammatory cell load. Analyzing MPO, a neutrophil enzyme found in azurophilic granule that is released by degranulation process and assists in clearance of microbes by generation of peroxidase-mediated oxidants that destroy leukocyte-engulfed pathogens²⁴, data show, in figure 5C, that after 1 and 3 days of infection, we have an accumulation of neutrophils in lungs ($2,832 \pm 1,257$ for 1 dpi and $1,830 \pm 601$ for 3 dpi), compared to non-infected mice. After these time points, MPO levels returned to basal levels.

On the other hand, macrophages, important inflammatory cells involved in clearance of the pathogen, apoptotic neutrophils and cellular debris²⁵, start to accumulate in the airways in the third day post *A. fumigatus* infection ($5.95 \times 10^5 \pm 2.11$) and its levels remain high until day 21, as we show at figure 5D. Indirect analysis of macrophage infiltrate to lung tissue was done by measuring NAG levels, lysosomal enzyme related to monocyte and macrophage activity²⁶. As a result, figure 5E shows that after 3 days of infection there is an augmentation of NAG levels (0.9734 ± 0.09), reaching in a peak 7 days after infection (1.883 ± 0.4). Moreover, there is an accumulation of lymphocytes in the airways of infected animals after 3 days of infection ($1.98 \times 10^5 \pm 1.19$), observed in figure 5F. Lymphocytes are important immune cells to establish and control the profile of immune response that will take place after an infection²⁷. In our model of pulmonary aspergillosis, we should consider that host immune response is almost exclusively based in innate immune system.

Discussion

Fungal infection, especially pneumonia, is related to host immunosuppression. In this way, there are innumerable models of fungal infection in immunocompromised animals^{10,28,29,30}. They represent important models to the study of pathogenicity of different fungal isolates and the relationship in host-pathogen during depression of immune system. Besides this, there is a lack of characterized animal models in immunocompetent hosts. In the present study, we characterize a model of acute pulmonary aspergillosis in an immunocompetent host. In addition, analysis of fungal burden did not reveal any signal of

growth conidia, indicating that this model is not a model of invasive aspergillosis. Our results show that *A. fumigatus* infection can be used as an animal model of fungal infection with lower mortality to investigate infectious and inflammatory processes and as an animal model with higher lethality (DL50 in a 3×10^8 conidia/mice), for studies of drug target characterization and/or drug development. Moreover, this animal model is also suitable for studies of co-infection with viruses, fungi or bacteria, studies of comorbidities such as alcoholism and chronic diseases, and inflammatory processes like resolution in infectious self-limited conditions. In agreement with our results, Dixon and colleagues (1989) demonstrated that there is a direct relationship between lethality and fungal load inoculum in an model of aspergillosis in immunocompromised host ³¹.

We observed intense body weight loss in both inocula from 1 to 6 days post infection and this morbidity signal is associated with fungal infection in the lungs. A study with a model of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection showed that loss of body mass occurs due the infectious inflammatory process, because body weight change is not related to changes in lung mechanics or differences in food intake, but with high levels of inflammatory cytokines and chemokines, such as TNF α , IL-1 β , IL-6, CXCL2/MIP-2, CXCL1/KC in BALF³². All these inflammatory mediators also play an important role in *A. fumigatus* infection¹³.

Studies related to lung diseases have depended, among various other approaches, on the verification of damaged organs histology on attempting to model human disease in non-human animals². In this sense, we also characterized histologic features in C57BL/6 mice response to *A. fumigatus*. An intense inflammatory reaction in lung parenchyma was seen in histological slides, which our data show a rapidly pulmonary inflammation, with a peak at 3 days post infection that progressively decreases until 21 days. It's extremely important to fully understand inflammatory parameters in pneumonia in immunocompetent hosts and the intervention forms to modulate that response to apply this intervention in immunocompromised hosts. These observations are confirmed by animal studies that demonstrated the practicability of changing the outcome of pneumonia by increasing or depleting specific inflammatory mediators³³. Furthermore, we found no significant differences in the amount of nitrite production at the site of infection, suggesting that nitric oxide plays no role in the killing of *A. fumigatus*. In this sense, Phillipe and colleagues (2003) demonstrated the contribution of NADPH oxidase and inducible nitric oxide synthase in phagocytosis and killing of conidia of *A. fumigatus* by alveolar macrophages. While the NADPH oxidase is essential for the killing of conidia, the nitric oxide synthase does not seem to play this pivotal role in the control of *A. fumigatus*³⁴. Likewise, another study also demonstrated that inhibition of nitric oxide does not affect the fungicidal activity of alveolar macrophages both murine and human cells³⁵.

Moreover, we found a good association between histologic analysis, vascular permeability and fungal burden in the 108 inoculum. We demonstrate that vascular permeability is elevated at 1 day post infection with highest levels at third day, while in HE staining and inflammatory score have the same pattern. Related to fungal load, CFUs after 3 days of infection is statistically reduced and undetectable after this time point.

In addition to the microbial invasion and the insight by the slides of lungs, we assessed the pattern of cellular response in infectious site, which is essential to understand the host-pathogen interactions in the outcome of pneumonia³³. Among PMN cells, we found that the *A. fumigatus* infection recruited neutrophils and eosinophils to the alveoli in early phases of infection, whereas neutrophils were the most prevalent cell type in BALF. These cells are widely documented to be the most effector cell that play an important role in acute pulmonary infections, including *A. fumigatus*. Furthermore, neutrophils recruited to an inflammatory site have a critical role against growing conidia and hyphae by several mechanisms, both intra- and extracellular. These mechanisms are phagocytosis, neutrophils extracellular traps (NETs) and degranulation^{13,36}. Eosinophils are also polymorphonuclear cells and play an important role in type 2 immunity and allergic inflammation³⁷, including allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA)^{13,37}. A study with immunocompetent mice with depletion of eosinophils showed that these mice have impaired fungal clearance and decrease of proinflammatory cytokines IL-1 β , IL-6, IL-17a, G-CSF, GM-CSF e CXCL1/KC, which compromises lung defenses in a model of ABPA with low inoculum (7×10^7 conidia)³⁸. Interestingly, MPO assay showed that lungs recruit a large number of neutrophils in the first day after infection and progressively decrease these cells without deposition of collagen and development of fibrosis. This finding was not seen in others models of pulmonary inflammation. Russo and colleagues demonstrate that antagonizing CXCR2, a neutrophils receptor to chemokines CXCL1 and CXCL2, decrease neutrophil migration and pulmonary fibrosis in a model of bleomycin-induced inflammation, suggesting the role of neutrophils in inducing pulmonary fibrosis¹⁸. Taken together, these results indicate a protective role of neutrophils and eosinophils in *A. fumigatus*-mediated lung inflammation.

Alveolar macrophages play a crucial role in phagocytosis of inhaled conidia of *A. fumigatus* in healthy individuals¹⁰. These macrophages are responsible for activating the pro-inflammatory response by secreting cytokines and chemokines, including TNF- α , CXCL1/KC and CXCL2/MIP-2, which will recruit neutrophils to the alveoli¹¹. In addition to the release of inflammatory mediators, macrophages dynamically change their phenotype and exhibit an anti-inflammatory profile, producing pro-resolutive mediators and high phagocytic ability, assisting in the removal of apoptotic cells³⁹. In our study, we demonstrated that

accumulation of these cells occurred after 3 days after challenge and remains high until 21 days, suggesting an important role of macrophage in tissue homeostasis in aspergillosis. Even though innate immune cells are involved in controlling *A. fumigatus* infection, we found in our aspergillosis model that lymphocytes take place in inflammation at 3 days post infection. Adaptive response, more specifically T cell-mediated response against the main *Aspergillus* species is not well understood⁴⁰. However, some studies have shown the importance of participation of lymphocytes in fungal infections. In *Cryptococcus neoformans* pulmonary infection, inflammation is gradually solved by T cell-dependent mechanisms. Thus, depletion of T cells caused a lower recruitment of macrophages and granulocytes and consequent failure to combat the pathogen³⁸. In a model of oral candidiasis using *Candida albicans* T-cell-deficient BALB/c mice displayed increased levels of oral colonization, with extensive hyphae penetrating the epithelium compared to control mice and developed a chronic oropharyngeal infection³⁹. In aspergillosis, further studies to identify the role of T helper lymphocytes and other elements of adaptive immune response for *Aspergillus* species are required.

Conclusions

Taken together, our results characterize a murine model of fungal pneumonia in immunocompetent mammal host, moreover we demonstrate histologically and biochemically the inflammatory response during the course of infection. Our model open an array of possibilities for the study of (i) fungal pulmonary infections with emphasis in the virulence determination of different fungal strains and isolates, (ii) inflammatory host response, (iii) drug target characterization, (iv) studies of co-infection, (v) studies of comorbidities and (vi) elucidation of inflammatory events like resolution process.

Acknowledgements

This work had financial support from FAPEMIG (APQ-01756-10; APQ-02198-14), Capes, CNPq (483184/2011-0), INCT em Dengue.

Reference

1. National Heart, Lung, and B. I. 2012 NHLBI Morbidity and Mortality Chart Book. 116 (2012). at <<http://www.nhlbi.nih.gov/research/reports/2012-mortality-chart-book>>

2. Williams, K. & Roman, J. Studying human respiratory disease in animals - Role of induced and naturally-occurring models. *J. Pathol.* 238, 220–32 (2015).
3. Norling, L. V. & Serhan, C. N. Profiling in resolving inflammatory exudates identifies novel anti-inflammatory and pro-resolving mediators and signals for termination. *J. Intern. Med.* 268, 15–24 (2010).
4. Daltro, P., Santos, E. N., Gasparetto, T. D., Ucar, M. E. & Marchiori, E. Pulmonary infections. *Pediatr. Radiol.* 41, (2011).
5. Mason, C. M. & Nelson, S. Pulmonary host defenses and factors predisposing to lung infection. *Clin. Chest Med.* 26, 11–17 (2005).
6. Alcón, A., Fàbregas, N. & Torres, A. Pathophysiology of pneumonia. *Clin. Chest Med.* 26, 39–46 (2005).
7. Brieland, J. K. et al. Cytokine networking in lungs of immunocompetent mice in response to inhaled *Aspergillus fumigatus*. *Infect. Immun.* 69, 1554–1560 (2001).
8. Lamoth, F. & Alexander, B. D. Nonmolecular methods for the diagnosis of respiratory fungal infections. *Clin. Lab. Med.* 34, 315–336 (2014).
9. Dagenais, T. R. T. & Keller, N. P. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in invasive aspergillosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 22, 447–465 (2009).
10. Perez-Nadales, E. et al. Fungal model systems and the elucidation of pathogenicity determinants. *Fungal Genet. Biol.* 70, 42–67 (2014).
11. Latgé, J. P. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 12, 310–350 (1999).
12. Kwon-Chung, K. J. & Sugui, J. A. *Aspergillus fumigatus*-What Makes the Species a Ubiquitous Human Fungal Pathogen? *PLoS Pathog.* 9, 1–4 (2013).
13. Margalit, A. & Kavanagh, K. The innate immune response to *Aspergillus fumigatus* at the alveolar surface. *FEMS Microbiol. Rev.* 39, 670–687 (2015).
14. Latgé, J. P. The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. *Trends Microbiol.* 9, 382–389 (2001).
15. Soriani, F. M. et al. Functional characterization of the *Aspergillus fumigatus*. 67, 1274–1291 (2008).
16. De Castro, P. A. et al. The involvement of the Mid1/Cch1/Yvc1 calcium channels in *Aspergillus fumigatus* virulence. *PLoS One* 9, (2014).
17. Soares, A. C. et al. Dual function of the long pentraxin PTX3 in resistance against pulmonary infection with *Klebsiella pneumoniae* in transgenic mice. *Microbes Infect.* 8, 1321–1329 (2006).
18. Russo, R. C. et al. Role of the chemokine receptor CXCR2 in bleomycin-induced pulmonary inflammation and fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 40, 410–421 (2009).

19. Tsikas, D. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: Appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 851, 51–70 (2007).
20. reddy1996.pdf.
21. Santiago, H. C. et al. NADPH phagocyte oxidase knockout mice control trypanosoma cruzi proliferation, but develop circulatory collapse and succumb to infection. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6, 1–8 (2012).
22. El Bounkari, O. & Bernhagen, J. Discovery of a startling star: chemotaxis and chemotactic inhibition by starfish MIFs. *Immunol. Cell Biol.* 94, 313–314 (2016).
23. Muller, W. A. Mechanisms of transendothelial migration of leukocytes. *Circ. Res.* 105, 223–230 (2009).
24. Huang, J. et al. Methods for measuring myeloperoxidase activity toward assessing inhibitor efficacy in living systems. *J. Leukoc. Biol.* 99, 541–548 (2016).
25. Basil, M. C. & Levy, B. D. Specialized pro-resolving mediators: endogenous regulators of infection and inflammation. *Nat Rev Immunol* 16, 51–67 (2016).
26. Reiner, R. G., Tanner, a R., Keyhani, a H. & Wright, R. A comparative study of lysosomal enzyme activity in monocytes and Kupffer cells isolated simultaneously in a rat model of liver injury. *Clin. Exp. Immunol.* 43, 376–380 (1981).
27. Koyasu, S. & Moro, K. Role of innate lymphocytes in infection and inammation. *Front. Immunol.* 3, 1–13 (2012).
28. Kim, J.-Y. Human fungal pathogens: Why should we learn? *J. Microbiol.* 54, 145–148 (2016).
29. Perfect, J. R. The impact of the host on fungal infections. *Am. J. Med.* 125, S39–S51 (2012).
30. Smith, J. A. & Kauffman, C. A. Pulmonary fungal infections. *Respirology* 17, 913–926 (2012).
31. Dixon, D. M., Polak, A. & Walsh, T. J. Fungus dose-dependent primary pulmonary aspergillosis in immunosuppressed mice. *Infect. Immun.* 57, 1452–1456 (1989).
32. Heeckeren, A. M. Van et al. Effect of Pseudomonas Infection on Weight Loss , Lung Mechanics , and Cytokines in Mice. 161, 271–279 (2000).
33. Mehrad, B. & Standiford, T. J. Use of Animal Models in the Study of Inflammatory Mediators of Pneumonia. *ILAR J.* 40, 167–174 (1999).
34. Heinekamp, T. et al. Interference of Aspergillus fumigatus with the immune response. *Semin. Immunopathol.* 37, 141–152 (2014).
35. Antl, M. et al. Killing of. *Cell. Microbiol.* 5, 343–351 (2003).

36. Kolaczowska, E. & Kubes, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 159–75 (2013).
37. Eng, S. S. & DeFelice, M. L. The Role and Immunobiology of Eosinophils in the Respiratory System: a Comprehensive Review. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 140–158 (2016). doi:10.1007/s12016-015-8526-3
38. Lilly, L. M. et al. Eosinophil deficiency compromises lung defense against *Aspergillus fumigatus*. *Infect. Immun.* 82, 1315–1325 (2014).
39. McCormick, S. M. & Heller, N. M. Regulation of macrophage, dendritic cell, and microglial phenotype and function by the SOCS proteins. *Front. Immunol.* 6, (2015).
40. Thakur, R. et al. Cytokines induce effector T-helper cells during invasive aspergillosis; what we have learned about T-helper cells? *Front. Microbiol.* 6, 1–6 (2015).

FIGURE LEGENDS

,Figure 1. *A. fumigatus* infection cause pulmonary aspergillosis in an inoculum dependent manner. Lethality and body weight change in our murine model of fungal pulmonary infection: C57 mice were intranasally infected with 40 μ L of suspension containing 108 or 3x108 conidia of *A. fumigatus* and monitored for 21 days. Comparative lethality (A) and body weight change (B) curves of control non-infected group (NI) and infected groups. Data are presented as Mean $\pm$ SD. * represents statistical significant difference ($p < 0.05$) between 108 infected group and control (NI). # represents statistical significant difference between 3x108 infected group and NI. Experiments were made with at least 7 mice per group.

Figure 2. Clearance of *A. fumigatus* from the airways. Lungs were collected 1 and 3 days after the infection. Homogenate from right lungs were plated on YG-agar. Left lungs were fixed with formaldehyde 4% and embedded in paraffin. Sections were stained with Grocott's methenamine silver. A) and B) Control NI group, C) and D) 1 day post infection (dpi), E) and F) 3 dpi. G) 3x108 inocula. H) Fungal load (CFU) after 1 and 3 dpi. Data are presented as Mean $\pm$ SD ($n = 3$ to 5 mice per group). * $p < 0.05$. Bars in A, C and E represent 100 μ m, while bars in B, D, F and G represent 25 μ m.

Figure 3. Histopathological changes during pulmonary Aspergillosis. Left lungs were collected 1, 3, 7, and 14 days after the *A. fumigatus* infection, fixed in formaldehyde 4% and embedded in paraffin. Sample sections ($n = 5$ to 7 mice per group) were stained with hematoxylin and eosin. A) and B) Control NI group, C) and D) 1 day post infection (dpi), E)

and F) 3 dpi, G) and H) 7 dpi, I) and J) 14 dpi. Bars in A, C, E, G and I represent 100 μm , while bars in B, D, F, H and J represent 25 μm .

Figure 4. Inflammatory and biochemical parameters during pulmonary Aspergillosis. BALF and lungs were collected 1, 3, 7, 14 and 21 days after *A. fumigatus* infection. A) Inflammatory score. Histological changes were graded on a 0 to 5-point scale. 0. no pathological change; 1. minimal tissue destruction and/or inflammation; 2. mild tissue destruction and/or inflammation; 3. moderate tissue destruction and/or inflammation; 4. marked tissue destruction and/or inflammation; 5. intense tissue destruction and/or inflammation. B) Lung collagen deposition was measure by determination of hydroxyproline concentration C) Total protein in BALFs were quantified as an indirect measure of vascular permeability and D) nitrite concentrations were biochemically measured in BALFs as an indirect determination of nitric oxide production (Greiss method). Data are presented as Mean $\pm$ SD (n= 4 to 8 mice per group) *p<0.05.

Figure 5. Inflammatory infiltrate into lungs and airways during pulmonary Aspergillosis. BALF and lungs were harvested at 1, 3, 7, 14 and 21 days after infection for inflammatory cell infiltrates determination. A) neutrophils, B) eosinophils, D) macrophages, F) lymphocytes. C) MPO and E) NAG assays were assessed to measure neutrophil and macrophage accumulation in lung tissue. Data are presented as Mean $\pm$ SD (n= 4 to 7 mice per group). *p<0.05.

FIGURE 1

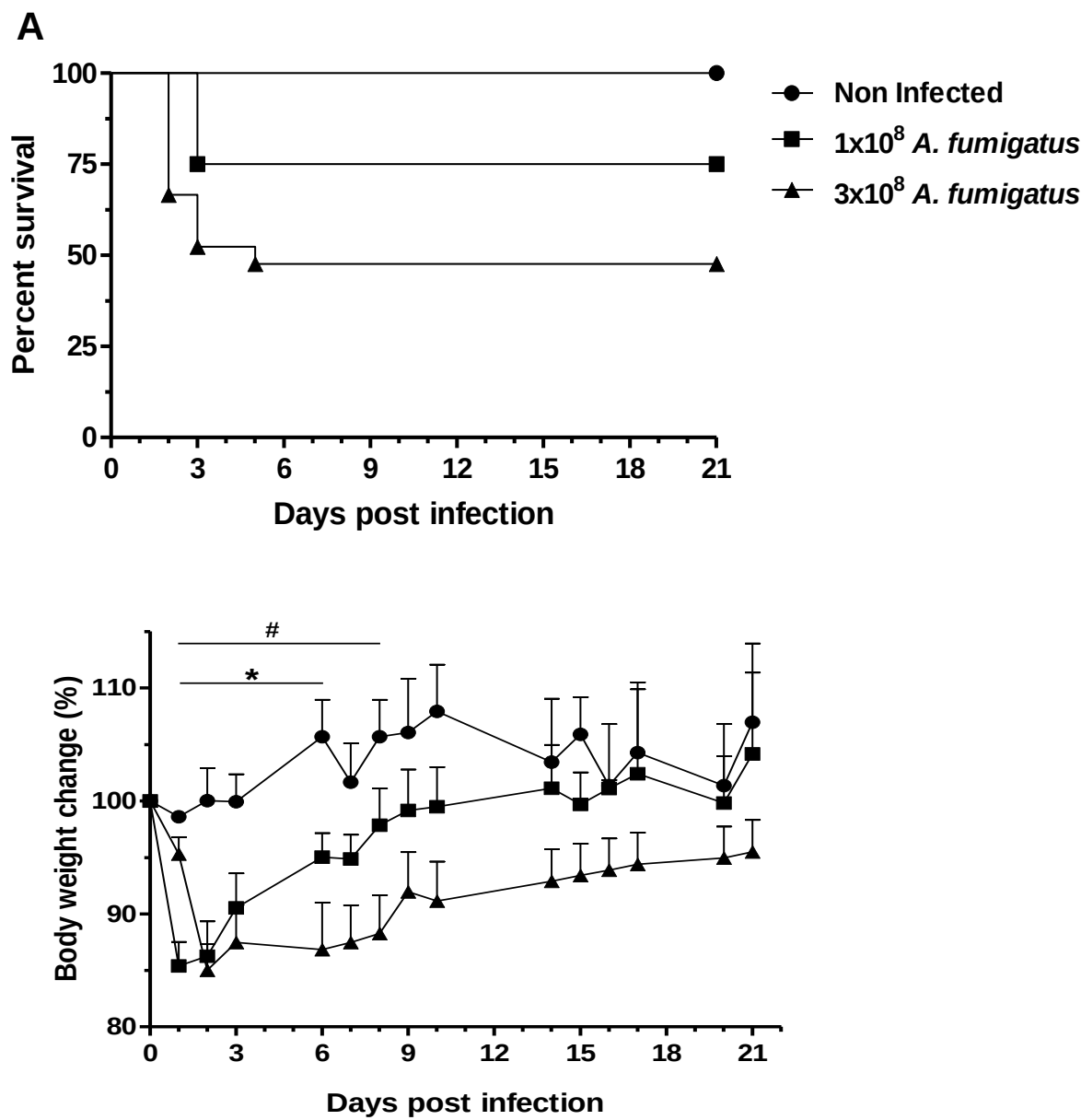


FIGURE 2

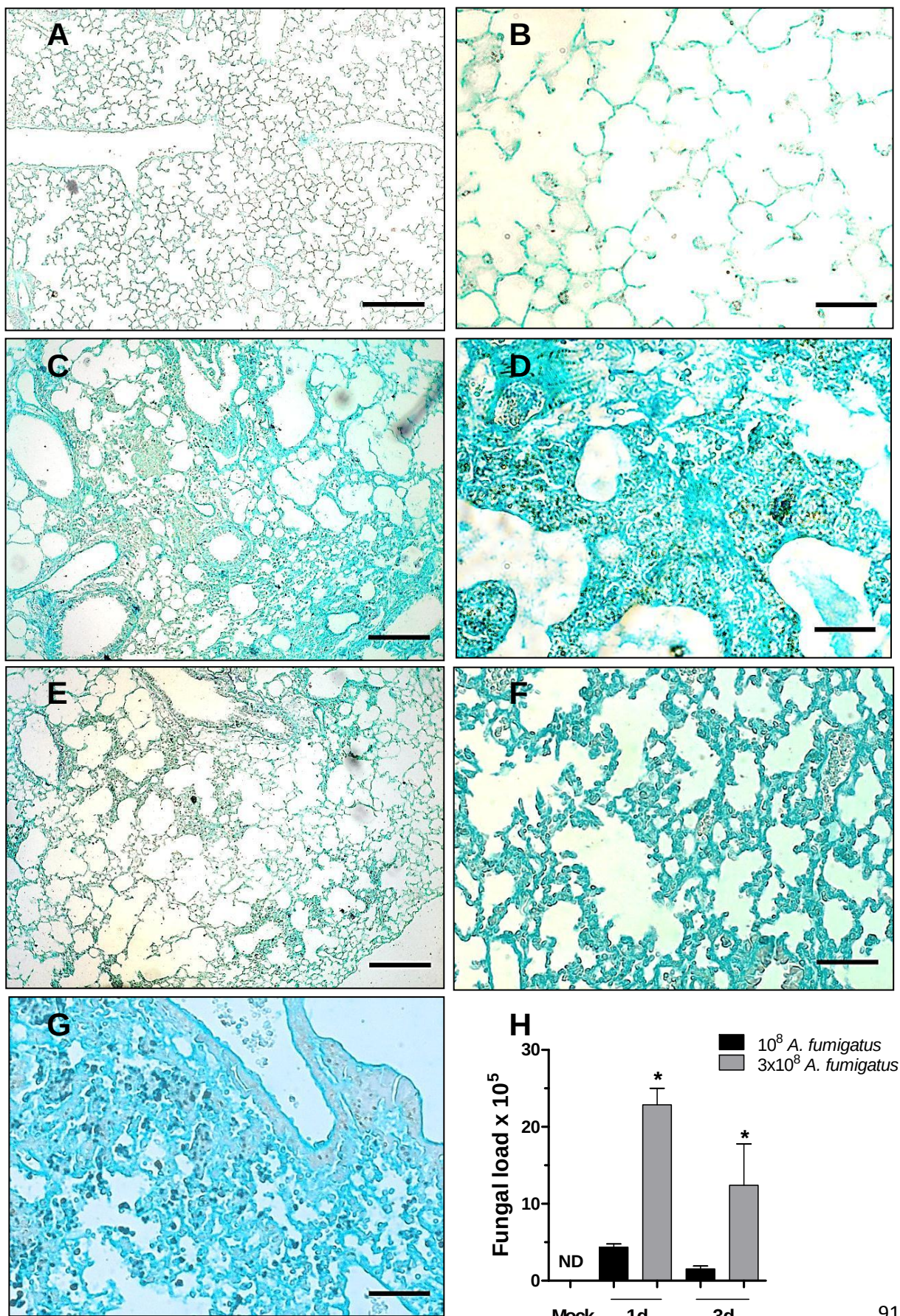
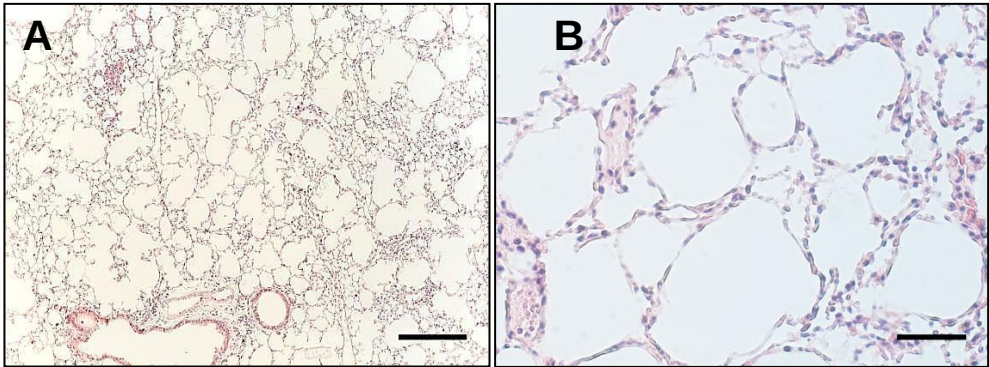
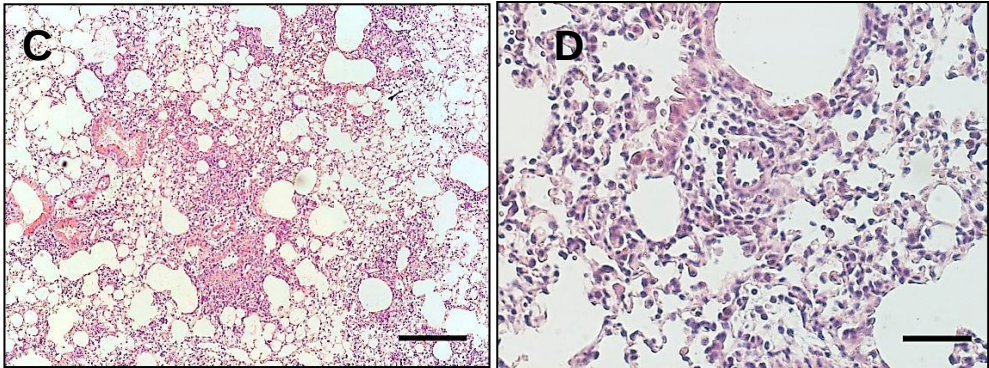


FIGURE 3

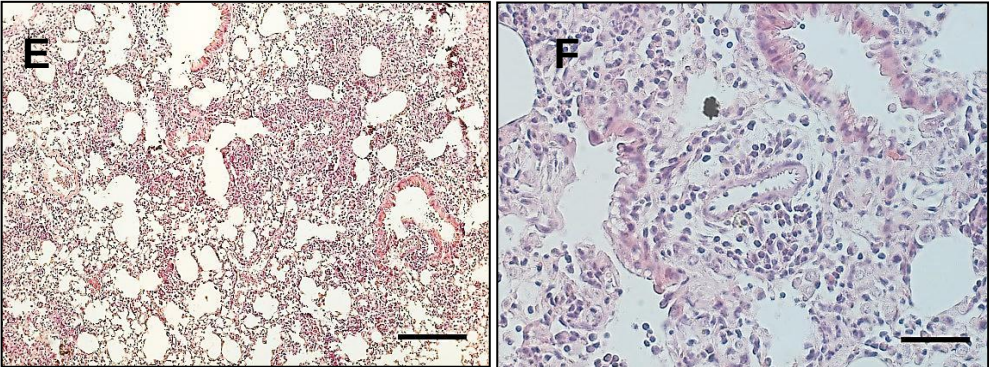
NI



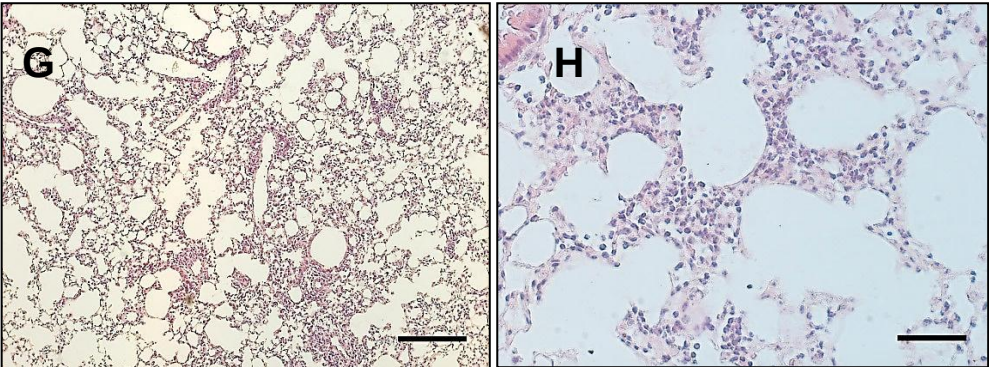
1 dpi



3 dpi



7 dpi



14 dpi

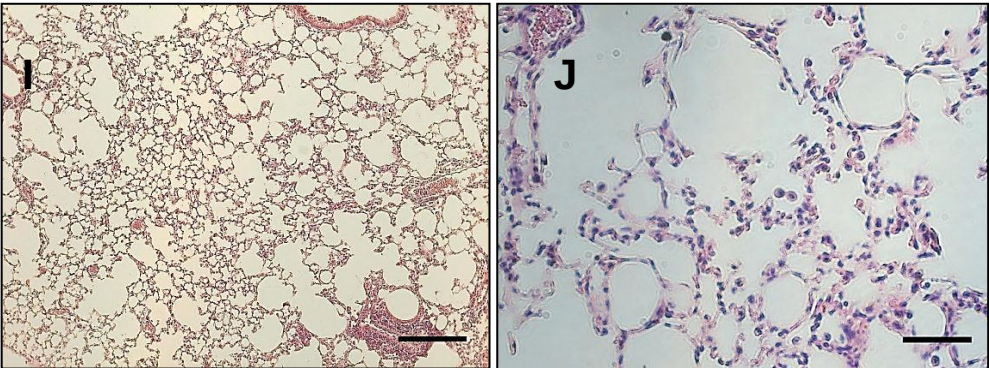


FIGURE 4

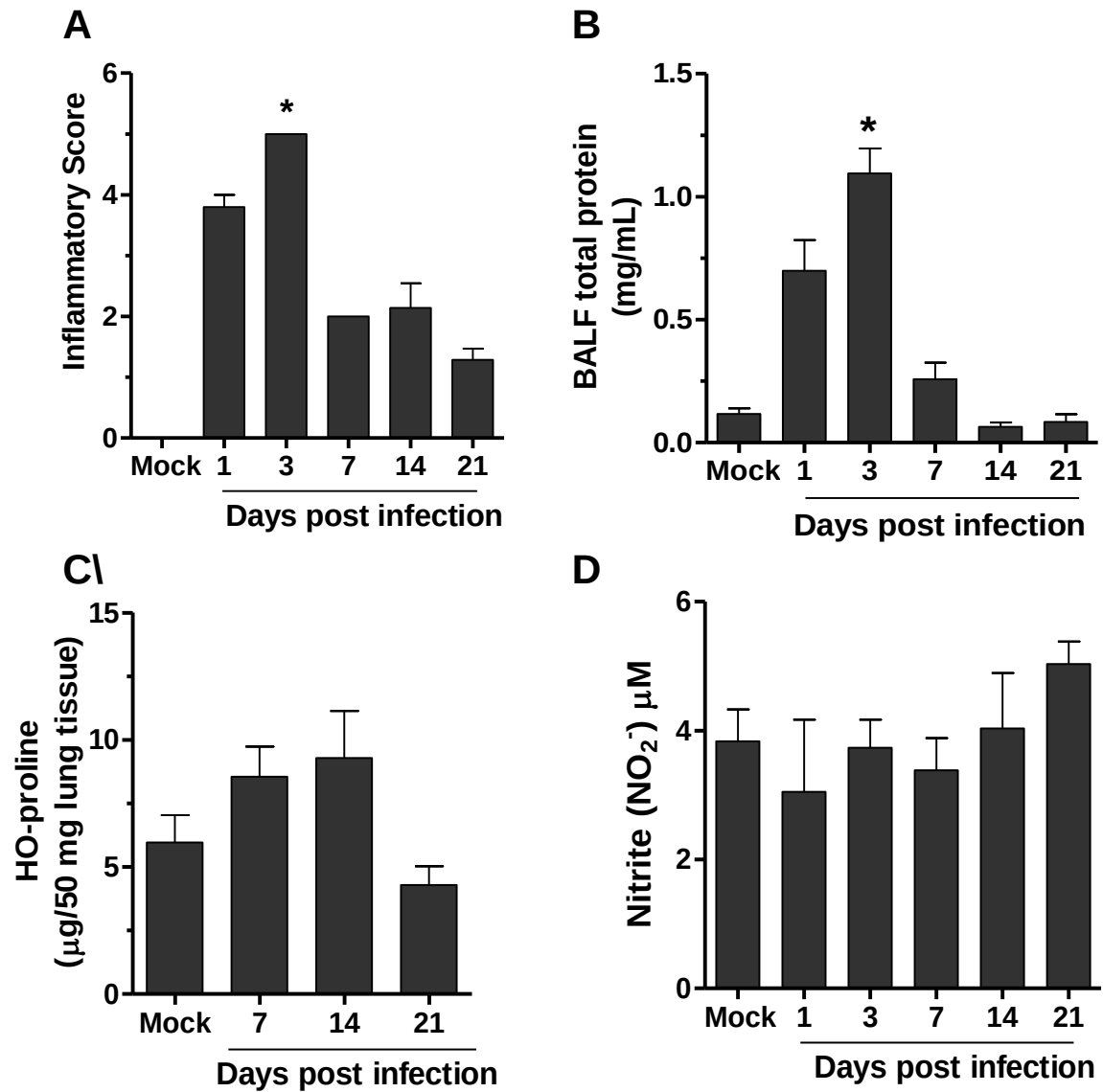


FIGURE 5

