

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



Tássia Tatiane Pontes Pereira

**O EFEITO DO CONSUMO CRÔNICO DE ETANOL NA MEDULA ÓSSEA EM UMA
PERSPECTIVA METABOLÔMICA**




Belo Horizonte

2023

TASSIA TATIANE PONTES PEREIRA

**O EFEITO DO CONSUMO CRÔNICO DE ETANOL NA MEDULA ÓSSEA EM UMA
PERSPECTIVA METABOLÔMICA**



Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Genética.

Orientador: Prof. Dr. Frederico Marianetti Soriani

Coorientadora: Profa. Dra. Adriana Nori de Macedo

Belo Horizonte

2023

043

Pereira, Tássia Tatiane Pontes.

O efeito do consumo crônico de etanol na medula óssea em uma perspectiva metabólica [manuscrito] / Tássia Tatiane Pontes Pereira. – 2023. 89 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Frederico Marianetti Soriani. Coorientadora: Profa. Dra. Adriana Nori de Macedo.

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

1. Genética. 2. Alcoolismo. 3. Medula Óssea. 4. Metaboloma. 5. Eicosanoides. 6. Sistema Imunitário. I. Soriani, Frederico Marianetti. II. Macedo, Adriana Nori de. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 575



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética

ATA DE DEFESA DE TESE

| | |
|--------------------------------------|----------------------------|
| ATA DA DEFESA DE TESE | 175/2023 |
| | entrada |
| Tássia Tatiane Pontes Pereira | 1º/2018 |
| | CPF: 081.384.656-03 |

Às quatorze horas do dia **22 de junho de 2023**, reuniu-se a Comissão Examinadora de Tese, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: "**O efeito do consumo crônico de etanol na medula óssea em uma perspectiva metabólica**", requisito para obtenção do grau de Doutora em **Genética**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **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 |
|--------------------------------------|------------------------------|----------------|------------------|
| Frederico Marianetti Soriani | UFMG | 249.486.428-35 | APROVADA |
| Vasco Ariston de Carvalho Azevedo | UFMG | 283.171.225-49 | APROVADA |
| Brenda Lee Simas Porto | UFMG-Departamento de Química | 073.565.966-44 | APROVADA |
| Luciana Pádua Tavares | Harvard Medical School | 107.292.666-05 | APROVADA |
| Pedro Manoel Mendes de Moraes Vieira | UNICAMP | 711.086.021-34 | 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, 22 de junho de 2023.

Frederico Marianetti Soriani-UFMG

Vasco Ariston de Carvalho Azevedo-UFMG

Brenda Lee Simas Porto-UFMG/Departamento de Química

Luciana Pádua Tavares- Harvard Medical School

Pedro Manoel Mendes de Moraes Vieira- UNICAMP



Documento assinado eletronicamente por **Luciana Padua Tavares, Usuário Externo**, em 22/06/2023, às 20:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vasco Ariston de Carvalho Azevedo, Professor do Magistério Superior**, em 23/06/2023, às 10:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Frederico Marianetti Soriani, Professor do Magistério Superior**, em 23/06/2023, às 10:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Brenda Lee Simas Porto, Professora do Magistério Superior**, em 26/06/2023, às 09:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Pedro Manoel Mendes de Moraes Vieira, Usuário Externo**, em 04/07/2023, às 16:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2402835** e o código CRC **9AF1DA88**.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética

FOLHA DE APROVAÇÃO

"O efeito do consumo crônico de etanol na medula óssea em uma perspectiva metabólica"

Tássia Tatiane Pontes Pereira

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Frederico Marianetti Soriani
UFMG

Vasco Ariston de Carvalho Azevedo
UFMG

Brenda Lee Simas Porto
UFMG

Luciana Pádua Tavares
Harvard Medical School

Pedro Manoel Mendes de Moraes Vieira
UNICAMP

Belo Horizonte, 22 de junho de 2023.



Documento assinado eletronicamente por **Luciana Padua Tavares, Usuário Externo**, em 22/06/2023, às 20:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vasco Ariston de Carvalho Azevedo, Professor do Magistério Superior**, em 23/06/2023, às 10:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Frederico Marianetti Soriani, Professor do Magistério Superior**, em 23/06/2023, às 10:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Brenda Lee Simas Porto, Professora do Magistério Superior**, em 26/06/2023, às 09:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Pedro Manoel Mendes de Moraes Vieira, Usuário Externo**, em 04/07/2023, às 16:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2402864** e o código CRC **FA15FDB6**.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Minas Gerais e ao Programa de Pós-Graduação em Genética pela oportunidade de realizar minha tese de pesquisa nessa renomada instituição.

Às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPEMIG pela concessão da bolsa de estudos e pelos recursos financeiros que viabilizaram a realização desta pesquisa.

Ao professor Frederico M. Soriani por me receber em seu laboratório e por toda a confiança, liberdade e autonomia que me foram concedidas durante a realização deste trabalho. Agradeço pela orientação e pelo valioso apoio na minha formação como pesquisadora e no meu crescimento pessoal.

À professora Adriana Nori de Macedo pela coorientação atenciosa e eficaz. Sou grata por todo o conhecimento compartilhado e por acolher as minhas dúvidas nessa abordagem tão desafiadora, a metabolômica.

Agradeço ao professor Vasco Ariston de Carvalho Azevedo e ao professor Sérgio Pontes Ribeiro por terem acreditado em mim e no meu potencial como pesquisadora. A vocês, minha gratidão e lealdade. Obrigada por tudo o que fizeram por mim.

Agradeço imensamente à professora Gisele André Baptista Canuto pela colaboração que se estendeu além desta tese. Expresso também minha gratidão ao professor Luiz Ricardo Goulart, que infelizmente não está mais entre nós, e a todos os seus colaboradores, pela parceria neste trabalho.

Agradeço aos colegas de pós-graduação Filipe Fidelis Duarte Andrade, Jessica Gardone Vitória e Joane Miari Corrêa pela colaboração neste trabalho e por compartilharem o conhecimento comigo. Vocês são exemplos de pessoas que fazem a diferença no ambiente acadêmico.

Agradeço aos meus colegas do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e do Laboratório de Genética Funcional pela convivência e companheirismo ao longo deste percurso. É gratificante ter compartilhado esse ambiente de trabalho com vocês.

Agradeço aos meus pais e irmãos pelo incentivo constante ao longo de toda a minha jornada pessoal e acadêmica.

Ao Alex, meu grande amor, pela cumplicidade, apoio incondicional e respeito às minhas escolhas ao longo desta jornada. Sua presença e suporte foram essenciais para me manter

motivada e confiante durante os desafios enfrentados na realização desta tese. Sou profundamente grata por ter você ao meu lado, compartilhando não apenas os momentos de sucesso, mas também os obstáculos superados. Obrigada por estar sempre presente e com seu constante bom humor.

Às minhas queridas filhas, Ágatha e Helena, o amor e o sorriso de vocês são o meu maior incentivo. Expresso aqui meu reconhecimento e gratidão à Maria Flor de Maio Viera Pires pela empatia e generosidade ao assumir o risco durante a pandemia do COVID-19 cuidando da Ágatha viabilizando, assim, a realização deste trabalho.

Aos amigos que carrego desde a infância, da faculdade e dos laboratórios pelos quais passei, minha gratidão pela amizade duradoura e pelo apoio que sempre demonstram. A amizade de vocês é valiosa e me fortalece.

“Imagination is more important than knowledge. For knowledge is limited, whereas imagination embraces the entire world, stimulating progress, giving birth to evolution.”

Albert Einstein

RESUMO

A hipótese deste estudo é que o metabolismo do etanol afeta vias metabólicas das células da medula óssea, resultando em alterações no conjunto de metabólitos que podem estar ligados à programação funcional do sistema imunológico. Para testar essa hipótese, utilizamos um modelo murino de consumo crônico de etanol e avaliamos o metaboloma das células presentes na medula óssea por meio de três abordagens: (i) cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS), utilizando como solventes extratores (ii) metanol ou (iii) uma mistura de clorofórmio, metanol e água. A análise por GC-MS identificou 19 metabólitos, sendo que 5 deles apresentaram menor abundância no grupo tratado com etanol: nicotinamida, succinato, uracila, prolina e tirosina. Já a análise por LC-MS, utilizando metanol como solvente de extração, possibilitou a identificação de 519 *molecular features*, dos quais 40 apresentaram diferenças significativas entre os grupos. Por sua vez, a análise utilizando a mistura de metanol, clorofórmio e água identificou 656 *molecular features*, sendo que 53 deles apresentaram diferenças significativas entre os grupos analisados. Diferentes classes químicas foram identificadas como aminoácidos, carboidratos e lipídios. De forma geral, os resultados obtidos demonstram que o consumo de etanol tem um impacto significativo no metabolismo lipídico da medula óssea. Houve uma inibição na degradação e ativação do metabolismo de ácidos graxos. Essas alterações resultaram em um aumento na abundância de glicerofosfolipídios, esfingolipídios e eicosanoides, que são componentes lipídicos com funções importantes na estrutura e sinalização celular, armazenamento de energia, bem como no processo inflamatório e na regulação funcional do sistema imunológico. Essas descobertas ressaltam a influência do consumo de etanol nos processos metabólicos envolvidos na resposta inflamatória e na modulação do sistema imunológico.

Palavras chaves: alcoolismo, medula óssea, metaboloma, metabolismo de ácidos graxos, glicerofosfolipídios, esfingolipídios, eicosanoides, sistema imune.

ABSTRACT

The hypothesis of this study is that ethanol metabolism affects the metabolic pathways of bone marrow cells, resulting in alterations in the metabolite profile that may be linked to the functional programming of the immune system. To test this hypothesis, we utilized a murine model of chronic ethanol consumption and evaluated the bone marrow cell metabolome through three approaches: (i) gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) using (ii) methanol or (iii) a mixture of chloroform, methanol, and water as extracting solvents. GC-MS analysis identified 19 metabolites, of which 5 showed lower abundance in the ethanol-treated group: nicotinamide, succinate, uracil, proline, and tyrosine. On the other hand, LC-MS analysis using methanol as the extraction solvent allowed the identification of 519 molecular features, of which 40 showed significant differences between the groups. Similarly, analysis using the mixture of methanol, chloroform, and water identified 656 molecular features, with 53 of them showing significant differences between the analyzed groups. Different chemical classes have been identified, such as amino acids, carbohydrates, and lipids. Overall, the results obtained demonstrated that ethanol consumption has a significant impact on lipid metabolism in the bone marrow. There was an inhibition in the degradation and activation of fatty acid metabolism. These changes resulted in an increase in the abundance of glycerophospholipids, sphingolipids, and eicosanoids, which are lipid components with important functions in cell structure and signaling, energy storage, as well as in the inflammatory process and functional regulation of the immune system. These findings highlight the influence of ethanol consumption on the metabolic processes involved in the inflammatory response and immune system modulation. Keywords: alcoholism, bone marrow, metabolome, fatty acid metabolism, glycerophospholipids, sphingolipids, eicosanoids, immune system.

Keywords: alcoholism, bone marrow, metabolome, fatty acid metabolism, glycerophospholipids, sphingolipids, eicosanoids, immune system

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Número total de pessoas com alcoolismo no mundo independente do sexo e idade. _____ 19
- Figura 2. Número absoluto de pessoas com alcoolismo no Brasil. _____ 8
- Figura 3. Metabolismo do etanol. O álcool é metabolizado por três vias. _____ 24
- Figura 4. Representação da progressão da maturação das múltiplas linhagens celulares presentes na medula óssea. _____ 27
- Figura 5. Fluxograma de trabalho da abordagem metabolômica. _____ 32
- Figura 6 Modelos multivariados dos molecular features nas amostras celulares provenientes da medula óssea analisadas por LC-MS utilizando metanol como solvente de extração. _____ 50
- Figura 7. Análise estatística de separação dos grupos e o padrão de abundância de 41 molecular features obtidos por meio do LC-MS utilizando solução de: metanol como solvente de extração. _____ 52
- Figura 8. Metabolitos identificados pela análise de LC-MS utilizando metanol como solvente de extração e os respectivos Fold Change (FC). _____ 55
- Figura 9. Análise de enriquecimento e impacto de vias. _____ 57
- Figura 10. Modelos multivariados de metabólitos identificados nas amostras celulares analisadas por LC-MS utilizando solução de metanol: clorofórmio e água como solvente de extração. _____ 59
- Figura 11. Análise estatística de separação dos grupos e o padrão de abundância dos molecular features obtidos por meio do LC-MS utilizando metanol como solvente _____ 61
- Figura 12. Metabolitos identificados pela análise de LC-MS utilizando metanol: clorofórmio: água como solvente de extração e os respectivos Fold Change (FC). _____ 64
- Figura 13. vias metabólicas enriquecidas e impactadas pela administração crônico de etanol. _____ 65
- Figura 14. Hipótese proposta a partir dos resultados encontrados através das três abordagens metabolômicas. _____ 75
- Figura 15. Análise da medula óssea para tamanho e complexidade na medula ossea de animais tratados com etanol e água por citometria de fluxo. _____ 86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Metabólitos identificados através da Cromatografia Líquida acoplada a espectrometria de massas utilizando e metanol como solvente de extração_____53.

Tabela 2. Metabólitos identificados através da Cromatografia Líquida acoplada a espectrometria de massas utilizando e metanol: clorofórmio: água como solvente de extração_____62.

ABREVIATURAS

| | |
|-----------------|---|
| GC-MS | Do inglês: <i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i> |
| LC-MS | Do inglês: <i>Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i> |
| CID-10 | Classificação Internacional de Doenças |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| AA | Alcoólicos Anônimos |
| IHME | Do inglês: <i>Institute for Health Metrics and Evaluation</i> |
| GBD | Do inglês <i>Global Burden of Disease Study</i> |
| SI | Sistema Imunológico |
| DCs | Células Dendríticas |
| PRRs | Receptores de Reconhecimento de Patógenos |
| PAMPs | Padrões Moleculares Associados a Dano |
| DAMPs | Padrões Moleculares Associados a Patógenos |
| Ig | Imunoglobulina |
| ADH | Álcool Desidrogenase |
| ALDH | Aldeído Desidrogenase |
| NAD | Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo |
| NADH | Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo reduzido |
| ROS | Espécies Reativas de Oxigênio |
| CE-MS | Do inglês: <i>Capillary Electrophoresis - Mass Spectrometry</i> |
| NMR | Do inglês: <i>Nuclear Magnetic Resonance</i> |
| ALD | Do inglês: <i>Alcoholic Liver Disease</i> |
| CEUA | Comissão de Ética no Uso de Animais |
| SPF | Do inglês: <i>Specific Pathogen Free</i> |
| HMDB | Do inglês: <i>Human Metabolome Database</i> |
| KEGG | Do inglês: <i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i> |
| ChEBI | Do inglês: <i>Chemical Entities Database of Biological Interest</i> |
| | Do inglês: <i>Partial Least Squares-Discriminant Analysis</i> |
| PLS-DA | Do inglês |
| PCA | Do inglês: <i>Principal Component Analysis</i> |
| QC | Do inglês <i>Quality Control</i> |
| VIP | Do inglês <i>Variable Importance Projection</i> |
| FC | Do inglês <i>Fold change</i> |
| MSEA | Do inglês <i>Metabolite Set Enrichment Analysis</i> |
| SMPDB | <i>Do inglês: Small Molecule Pathway Database</i> |
| CFU-Gemm | Do inglês Colony Forming Units-Gemm (Gemm: células precursoras mieloides) |
| | Do inglês Colony Forming Units-L (L: células precursoras linfoides) |
| CFU-L | |
| EtOH | Etanol |
| CLAE | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência |
| IES | Ionização por Eletrospray |
| IPO | Do inglês: <i>Isotopologue Parameter Optimization</i> |

| | |
|--------------|---|
| AG | Ácidos graxos |
| GF | Glicerofosfolipídios |
| AA | Ácido araquidônico |
| CoA | Coenzima A |
| DAG | Diacilglicerol |
| PI3P | Fosfatidilinositol 3-fosfato |
| PIP2 | Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato |
| CER | Cermida |
| S1F | Esfingosina-1-fosfato |
| CF | Fibrose Cística |
| S1P1 | Do inglês: Sphingosine-1-Phosphate receptor 1 |
| COX | Cicloxigenase |
| LOX | Lipoxigenase |
| BFU-E | Do inglês: Burst-forming Unit Erythroid |
| CFU-E | Do inglês: Colony-forming Unit Erythro |
| PGE1 | Prostaglandina E1 |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 18 |
| 1.1. ALCOOLISMO | 18 |
| 1.2. SISTEMA IMUNE E ALCOOLISMO..... | 20 |
| 1.3. METABOLISMO DO ETANOL E SEU EFEITO IMUNOMODULADOR..... | 23 |
| 1.4. MEDULA ÓSSEA E ALCOOLISMO..... | 26 |
| 1.5. ESTUDOS METABOLÔMICOS..... | 29 |
| 2. JUSTIFICATIVA..... | 32 |
| 3.1. OBJETIVO GERAL | 33 |
| 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 33 |
| 4. METODOLOGIA | 34 |
| 4.1. ANIMAIS EXPERIMENTAIS | 34 |
| 4.2. MODELO ANIMAL DE TRATAMENTO CRÔNICO COM ETANOL | 34 |
| 4.3. OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS..... | 34 |
| 4.4. EXTRAÇÃO DOS METABÓLITOS | 35 |
| 4.5. TRATAMENTO DOS DADOS | 36 |
| 5. RESULTADOS..... | 38 |
| 5.1. CAPÍTULO 1 – ANÁLISE METABOLÔMICA DE CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS TRATADOS E NÃO TRATADOS COM ETANOL POR CROMATOGRAFIA A GÁS ACOPLADA AO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS..... | 38 |
| 5.2. CAPÍTULO 2. ANÁLISE METABOLÔMICA POR LC-MS UTILIZANDO METANOL COMO SOLVENTE DE EXTRAÇÃO. | 49 |
| 5.2.1. O CONSUMO CRÔNICO DE ETANOL ALTERA O PERFIL METABOLÔMICO DA MEDULA IMPACTANDO O METABOLISMO DE ÁCIDOS GRAXOS E O METABOLISMO DO ÁCIDO ARAQUIDÔNICO. | 49 |
| 5.3. CAPÍTULO 3. ANÁLISE METABOLÔMICA POR LC-MS UTILIZANDO METANOL CLOROFÓRMIO E ÁGUA | 59 |
| 5.3.1. A ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE ETANOL IMPACTA O METABOLISMO DE GLICEROFOSFOLÍDIOS, ESFINGOLÍDIOS E DO ÁCIDO ARAQUIDÔNICO | 59 |
| 6. DISCUSSÃO | 67 |
| 7. CONCLUSÃO | 76 |
| 8. PERSPECTIVAS..... | 76 |
| 9. REFERÊNCIAS..... | 79 |
| 10. ANEXOS | 86 |

1. INTRODUÇÃO

1.1. Alcoolismo

O alcoolismo é uma doença reconhecida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e está incluída na 10ª edição da Classificação Internacional de Doenças (CID-10). Ela é caracterizada por uma série de fatores comportamentais, cognitivos e fisiológicos que se desenvolvem como resultado do uso repetido de álcool. Esses fatores incluem um forte desejo de beber, dificuldade em controlar o consumo, uso continuado apesar das consequências negativas, priorização do consumo de álcool em detrimento de outras atividades e obrigações, aumento da tolerância e, às vezes, um estado de abstinência física que pode incluir sintomas como sudorese, tremores e ansiedade (ANDRADE, 2019).

O alcoolismo é considerado uma doença progressiva, que se desenvolve lentamente e de forma silenciosa ao longo do tempo. O tratamento mais eficaz para o alcoolismo envolve uma combinação de terapia individual, terapia em grupo e envolvimento da família, como é o caso dos Alcoólicos Anônimos (AA). Além disso, existem medicamentos disponíveis, como a Naltrexona, Acamprosato e Dissulfiram, que podem ser utilizados para ajudar a diminuir o desejo de beber ou causar uma reação aversiva quando a pessoa consome álcool (NATIONAL INSTITUTE ON ALCOHOL AND ALCOHOLISM, 2013).

Ao longo da história, a produção e o consumo de bebidas alcoólicas têm desempenhado um papel importante em diversas culturas, agregando valor cultural e econômico. Isso contribui para que o álcool seja uma das substâncias psicoativas mais utilizadas em todo o mundo (HAMMER et al., 2018). Segundo a Organização Mundial da Saúde, aproximadamente metade da população adulta global consome álcool regularmente. Como resultado, o alcoolismo está presente em todos os países do mundo, como mostrado no mapa do Instituto de Métricas e Avaliação em Saúde (IHME) (Figura 1).

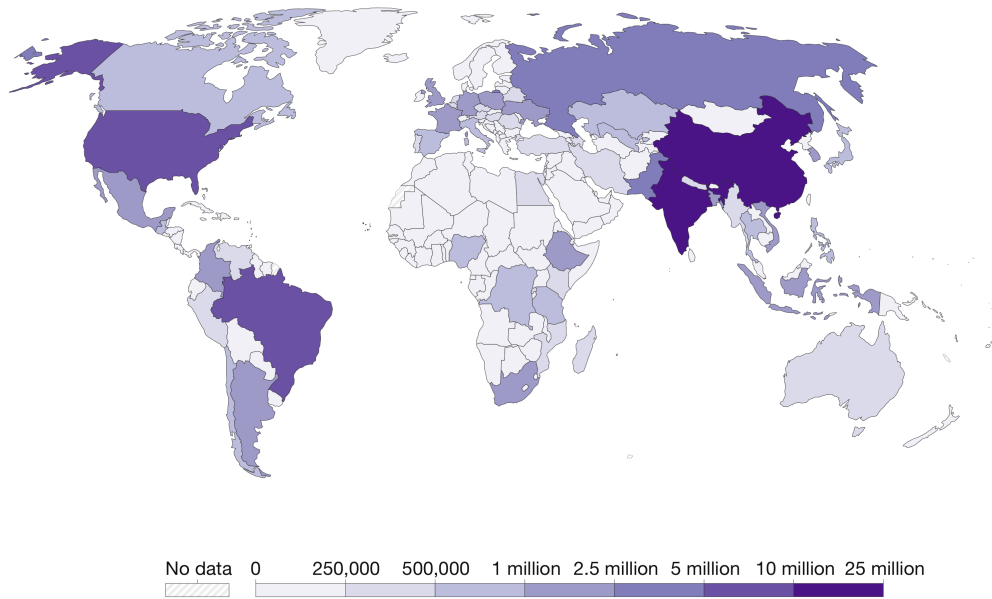


Figura 1. Número total de pessoas com alcoolismo no mundo independente do sexo e idade. Fonte: Global Burden of Disease Collaborative Network. Global Burden of Disease Study 2019 (GBD 2019) Results. Seattle, United States: Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME),2023

O uso excessivo de álcool tem impactos sociais e econômicos significativos. O consumo descontrolado aumenta o risco de acidentes, reduz a produtividade no local de trabalho e contribui para o aumento das taxas de criminalidade e violência (GRANT et al., 2015) . Os gastos públicos decorrentes do consumo abusivo de álcool, que incluem despesas relacionadas ao sistema de saúde, sistema judiciário e previdenciário, custam anualmente à sociedade brasileira aproximadamente 7,3% do Produto Interno Bruto (PIB) do país, o equivalente a R\$ 2 bilhões. Deste total, 2,4%, o equivalente a R\$ 40 milhões, é atribuído ao tratamento de condições clínicas provocadas pelo alcoolismo (HAMMER et al., 2018)

No Brasil, a incidência do alcoolismo tem aumentado progressivamente desde a década de 1920, com uma leve queda em 2018 (Figura 2). Atualmente, estima-se que cerca de 7 milhões de pessoas sejam afetadas pela doença.

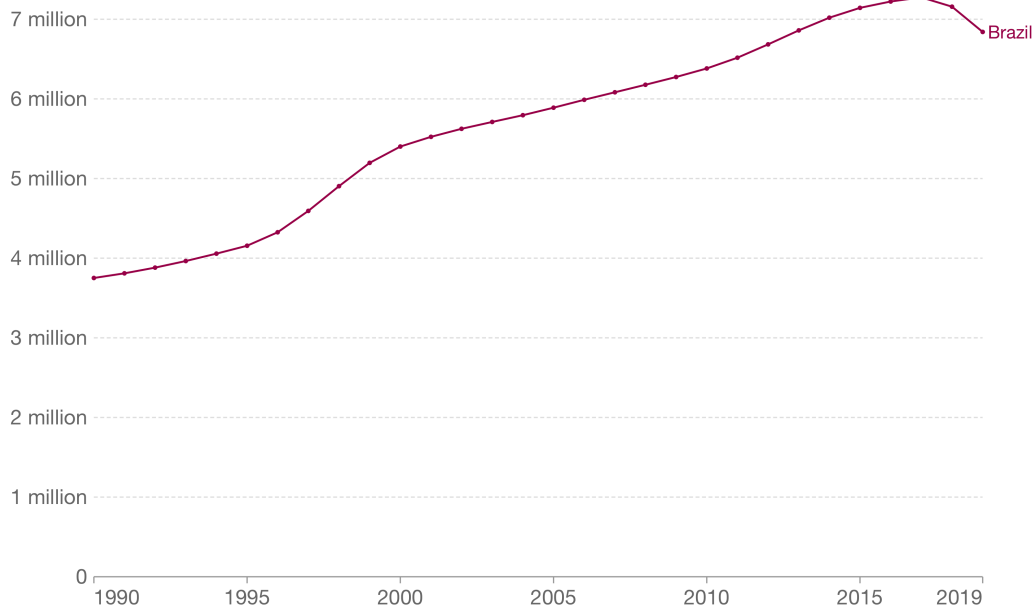


Figure 2. Número absoluto de pessoas com alcoolismo no Brasil, medido através de ambos sexos e todas idades, 1990- 2019. Fonte: Global Burden of Disease Collaborative Network. Global Burden of Disease Study 2019 (GBD 2019) Results. Seattle, United States: Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME),2023

A ampla disseminação do alcoolismo, juntamente com sua natureza progressiva e os aspectos culturais relacionados ao consumo de bebidas alcoólicas, contribuem para dessensibilização da população em relação à gravidade da doença. No entanto, é importante ressaltar que o alcoolismo é uma doença grave que pode levar à morte do paciente. De acordo com o Instituto de Métricas e Avaliação em Saúde (IHME), em 2019 o alcoolismo foi responsável por 3 milhões de mortes em todo o mundo e 7 mil mortes no Brasil.

As mortes diretas devido ao alcoolismo estão relacionadas com doenças que se estabelecem no organismo do paciente em decorrência do efeito do álcool em diversos órgãos e tecidos. Essas doenças se estabelecem porque o consumo crônico de álcool, tem efeitos profundos no sistema imune promovendo reações inflamatórias, que contribuem para o dano tecidual em diversos órgãos levando assim ao estabelecimento de diferentes tipos de doenças como câncer e inflamações crônicas (WANG, 2015).

1.2. Sistema Imune e Alcoolismo

O Sistema Imunológico (SI) pode também ser entendido como uma rede interativa composta por órgãos linfoides, células, tecidos e moléculas que trabalham

em conjunto para proteger o corpo contra agentes infecciosos e danos. A programação funcional do sistema imunológico envolve três etapas fundamentais: identificação do patógeno e/ou dano tecidual, ativação dos mecanismos de defesa e combate à infecção e/ou lesão. (KELLIE; AL-MANSOUR, 2017).

A identificação de agentes lesivos, sejam patogênicos ou não, ocorre também por meio da imunidade inata, que é um dos dois ramos em que o Sistema Imunológico (SI) didaticamente pode ser compreendido. Esse ramo proporciona ao organismo uma resposta imediata e rápida, ativada de maneira inespecífica por qualquer patógeno ou dano tecidual. As células imunes inatas, como as células *natural killer* (NK), neutrófilos, monócitos, macrófagos e células dendríticas (DCs), expressam receptores de reconhecimento de patógenos (PRRs) que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e a danos teciduais (DAMPs) (ROBERTS, 2014).

A interação dos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) com os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e a danos teciduais (DAMPs) ativa as células do sistema imunológico inato, desencadeando processos de fagocitose e a liberação de citocinas e quimiocinas, por exemplo. Essa resposta imediata resulta na indução de uma resposta inflamatória localizada e na mobilização de células imunes para o local da infecção.

O sistema imunológico adaptativo, que é a segunda ramificação pela qual o sistema imunológico pode ser didaticamente compreendido, pode ser subdividido em imunidade mediada por células, realizada pelas células T, e imunidade humoral, realizada pelas células B. As células T que expressam o co-receptor de células T CD4 são conhecidas como células T auxiliares e desempenham um papel crítico na ativação e maturação de monócitos, células T citotóxicas e células B. As células T que expressam o co-receptor de células T CD8 são conhecidas como células T citotóxicas e são responsáveis por eliminar células hospedeiras infectadas por patógenos intracelulares, bem como células tumorais. As células B amadurecem em células plasmáticas que produzem anticorpos, também conhecidos como imunoglobulinas (Ig), para eliminar microorganismos extracelulares e prevenir a propagação da infecção (ROBERTS, 2014).

A inflamação é um processo desencadeado pela ativação do sistema imunológico em resposta a infecções ou lesões teciduais. Esse processo envolve a produção de mediadores inflamatórios, incluindo os eicosanoides, que são

mediadores lipídicos. Os eicosanoides desempenham um papel crucial na promoção das mudanças necessárias para a montagem da resposta imune, como a vasodilatação, aumento do fluxo sanguíneo e aumento da permeabilidade vascular, facilitando assim a migração de leucócitos para o local afetado. No entanto, quando a inflamação é ativada de forma excessiva ou persistente, pode levar a danos em órgãos e sistemas, resultando em uma condição de inflamação crônica. (LEUTI et al., 2020).

O consumo de álcool afeta a programação funcional do sistema imunológico de forma dependente da dose. No caso do consumo agudo, que envolve o consumo de uma grande quantidade em um curto período de tempo, o álcool tende a inibir a resposta inflamatória. Por outro lado, no consumo crônico, que é caracterizado pelo uso repetitivo e compulsivo da substância, observa-se um perfil de resposta inflamatória exacerbado. (MOLINA et al., 2010; SARKAR; JUNG; WANG, 2015).

Malacco e colaboradores (2020) demonstraram que o consumo crônico de etanol resulta em uma regulação negativa dos receptores CXCR2 em neutrófilos devido ao aumento de ligantes no fluxo sanguíneo. Isso resulta em um recrutamento reduzido de neutrófilos para o local da infecção. Além disso, observou-se que as células fagocíticas nos tecidos apresentam uma capacidade reduzida de fagocitar e eliminar o patógeno, resultando em uma carga fúngica aumentada nos pulmões de camundongos. (MALACCO et al., 2020).

O consumo crônico de etanol também tem impacto negativo sobre a resposta imune adaptativa, especialmente no que diz respeito às células dendríticas. Essas células desempenham um papel crucial na apresentação de antígenos e no início da resposta imune adaptativa nos tecidos. Além disso, o etanol interfere no processo de diferenciação dessas células, comprometendo sua capacidade de adquirir um estado totalmente maduro e funcional. Isso resulta em uma deficiência na capacidade das células dendríticas de estimular outras células imunes, como linfócitos T e B, levando a uma resposta imune comprometida (SZABO; SAHA, 2015).

Outro efeito prejudicial do consumo crônico de etanol sobre as células dendríticas é a interferência em suas funções de englobamento de partículas extracelulares e limpeza de microrganismos no sítio infeccioso. Além disso, o consumo crônico de etanol também afeta a expressão de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) nas células dendríticas, resultando em uma

redução na capacidade destas células de detectar e responder adequadamente aos patógenos (KANY; JANICOVA; RELJA, 2019)

As células T CD4+ auxiliares auxiliam na ativação e diferenciação de outras células imunes. O consumo crônico de álcool tem sido associado a alterações nas células T CD4+, resultando em redução da produção de citocinas e diminuição da capacidade de auxiliar outras células imunes. Isso compromete a resposta imune adaptativa, afetando a capacidade de combater infecções e regular as respostas imunes (SARKAR; JUNG; WANG, 2015).

As células T CD8+ citotóxicas têm a função de eliminar células infectadas por patógenos intracelulares e células tumorais. O consumo crônico de álcool afeta a atividade das células T CD8+, resultando em uma diminuição da resposta citotóxica e comprometimento da capacidade de eliminar células-alvo (SARKAR; JUNG; WANG, 2015). Isso pode levar a uma resposta imune deficiente contra infecções intracelulares e ao crescimento de células tumorais.

As células B são responsáveis pela produção de anticorpos, que desempenham um papel crucial na resposta imune humoral. O consumo crônico de álcool pode interferir na função das células B, afetando a produção de anticorpos e comprometendo a resposta imune humoral (PASALA; BARR; MESSAOUDI, 2015). Isso pode levar a uma menor capacidade de neutralizar patógenos e reduzir a eficácia da resposta imune contra infecções.

De maneira geral a extensa literatura científica que investiga os efeitos do álcool nas diferentes células do sistema imunológico revela consistentemente o comprometimento das funções celulares, levando a uma reduzida capacidade de eliminar patógenos e maior propensão a danos teciduais. Esses efeitos culminam em um estado de inflamação persistente, mantendo um estímulo contínuo para a ativação do sistema imunológico.

1.3. Metabolismo do etanol e seu efeito imunomodulador

Os efeitos do consumo de álcool no organismo, incluindo no sistema imune, estão intimamente relacionados ao seu metabolismo. Compreender esse processo é fundamental para entender os mecanismos fisiopatológicos associados.

O metabolismo do etanol, tipo de álcool presente nas bebidas alcoólicas, ocorre por via oxidativa e não oxidativa. Na via oxidativa, as enzimas envolvidas são a álcool desidrogenase (ADH) e a aldeído desidrogenase (ALDH). Alternativamente, o álcool pode ser metabolizado pelas enzimas do complexo Citocromo P450 e pela via da Catalase Peroxissomal, conferindo um mecanismo alternativo, geralmente induzido pelo consumo crônico e em grandes quantidades (PAQUOT, 2019; ZAKHARI, 2006). Isso ocorre quando há o consumo diário de mais de 20 g de álcool puro ou consumo em mais de 20 dias seguidos, em qualquer quantidade (GUERRA et al., 2020).

Existem diferentes variantes das enzimas ADH e ALDH, resultantes de polimorfismos genéticos. Essas variações afetam a cinética da reação, sendo um dos fatores genéticos relacionados à maior ou menor susceptibilidade do indivíduo ao desenvolvimento do alcoolismo e a doenças secundárias relacionadas ao consumo de álcool (ONG et al., 2018).

A enzima ADH está presente no citoplasma das células e é responsável pela oxidação do etanol, resultando em acetaldeído. Essa etapa do metabolismo envolve o carreador de elétrons Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (NAD^+), que é reduzido a NADH. A enzima ALDH também é responsável pela segunda etapa do metabolismo, que ocorre nas mitocôndrias e converte o primeiro subproduto, o acetaldeído, em acetato. Nessa etapa, ocorre a redução de NAD^+ a NADH (figura 3) (ZAKHARI, 2006).

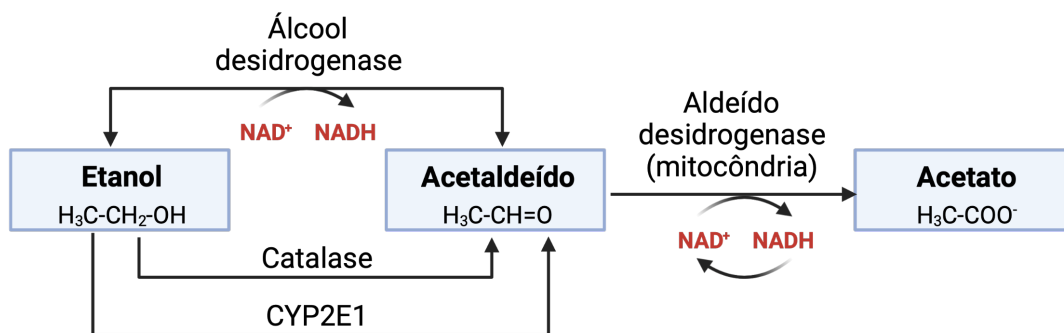


Figura 3. Metabolismo do etanol. O álcool é metabolizado por três vias. A mais comum delas envolve as enzimas álcool desidrogenase (ADH) e aldeído desidrogenase (ALDH). ADH metaboliza o álcool em acetaldeído. A ALDH converte o acetaldeído em acetato. Ambas as enzimas reduzem NAD^+ à NADH. As enzimas 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: Adaptado de <https://cisa.org.br/sua-saude/informativos/artigo/item/47-metabolismo-do-alcool>.

Embora a primeira etapa do metabolismo do etanol seja mais lenta do que a segunda, reduzindo consideravelmente a disponibilidade do acetaldeído no

organismo, esse composto é altamente tóxico e pode danificar células e tecidos. O acetaldeído tem sido correlacionado com a maioria dos efeitos imunomoduladores do álcool. Isso porque ele forma adutos que modulam a expressão de genes que medeiam a resposta imune (LE DARÉ; LAGENTE; GICQUEL, 2019a).

O estresse oxidativo resultante da redução de NAD^+ para NADH que ocorre em ambas as etapas do metabolismo, os adutos de acetaldeído e a geração de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) ativam o inflamassoma NLRP3, um componente do sistema imunológico inato e importante regulador da inflamação crônica. A ativação desse complexo proteico desempenha um papel fundamental no efeito pró-inflamatório do consumo crônico de álcool (HYOCHOL AHN, PHD, MICHAEL WEAVER, PHD, DEBRA LYON, PHD, EUNYOUNG CHOI, RN, AND ROGER B. FILLINGIM, 2017)

Além disso, o consumo crônico de etanol afeta os receptores purinérgicos, que também são capazes de ativar o inflamassoma NLRP3 (Gicquel et al. 2017). Os efeitos indiretos do acetaldeído na imunomodulação estão relacionados à formação de adutos que modulam a expressão de genes importantes para a síntese de citocinas que medeiam a resposta imune (LE DARÉ; LAGENTE; GICQUEL, 2019b).

Embora a maioria dos efeitos imunomoduladores do álcool esteja relacionado direta ou indiretamente ao acetaldeído, a intensa produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) promove estresse oxidativo, danificando tecidos, estruturas celulares como membranas e o DNA (PAQUOT, 2019).

Além disso, o acetato, produto resultante da oxidação do acetaldeído, embora seja oxidado a dióxido de carbono (CO_2) e liberado pelos pulmões, não é um produto inerte. Ele pode ser convertido em Acetil-CoA, um metabólito intermediário que participa de vias bioquímicas fundamentais para suprir as demandas energéticas e biossintéticas das células (NIAAA, 2002; ZAKHARI, 2012) afetando processos bioquímicos como a síntese de ácidos graxos (YOU; ARTEEL, 2019b).

O efeito do etanol no metabolismo energético celular e seu impacto em vias como a fosforilação oxidativa, que já foram descritos em hepatócitos (YOU; ARTEEL, 2019b), podem estar relacionados ao efeito do álcool no sistema imune, uma vez que o metabolismo celular tem sido associado à funcionalidade das células.

Estudos realizados por Sadiku e colaboradores (2021) demonstraram que os neutrófilos produzem glicogênio para suprir suas demandas bioenergéticas,

garantindo assim a capacidade fagocítica e a eliminação do patógeno por meio do "killing". Em pacientes com inflamação crônica, os neutrófilos apresentam comprometimento da gliconeogênese, resultando em menor produção bioenergética e capacidade prejudicada de fagocitose e depuração do patógeno (SADIKU et al., 2021).

Nos últimos anos, tem havido um crescimento significativo no conhecimento sobre como a função das células do sistema imune é mediada pelo metabolismo celular (MICHAELS; MADSEN, 2023; VAN DEN BOSSCHE; HORNG; RYAN, 2023). Essa área de conhecimento tem permitido uma melhor compreensão do mecanismo da resposta imune em uma perspectiva bioquímica (BULLUCK; HAUSENLOY, 2018). O metabolismo do etanol, que apresenta uma preferência pela oxidação em relação a outros substratos energéticos, resultando em uma diminuição na oxidação de lipídios (PAQUOT, 2019), pode impactar as vias metabólicas das células do sistema imune e comprometer sua programação funcional.

1.4. Medula óssea e alcoolismo

A medula óssea é um dos principais tecidos que compõe a rede interativa do sistema imune. É um tecido gelatinoso localizado no interior dos ossos, cuja função consiste na produção dos elementos figurados do sangue através de um processo complexo denominado hematopoiese (TRAVLOS, 2006).

A hematopoiese se dá a partir da proliferação das células-tronco pluripotentes em células precursoras mieloides e linfóides (CFU-Gemm e CFU-L respectivamente). Estas por sua vez, a partir de uma série de estágios intermediários rigidamente regulados, se multiplicam, se diferenciam e amadurecem em centenas de milhares de outros tipos celulares agrupados em hemácias, leucócitos ou plaquetas, que podem ser liberadas na corrente sanguínea (Figura 4) (TRAVLOS, 2006).

O desenvolvimento e maturação de todos elementos do sangue os quais são continuamente renovados e respondem prontamente a necessidade do organismo, fazem com que a medula óssea seja caracterizada por grande atividade proliferativa (GURKAN; AKKUS, 2008).

Dados da literatura que datam desde 1960 vêm mostrando que o álcool causa uma redução no número de células precursoras mieloides e células precursoras

linfoides. Esse efeito vem sendo correlacionado com o fato de pacientes que sofrem de alcoolismo apresentarem quadros de anemia (POST; DESFORGES, 1968)

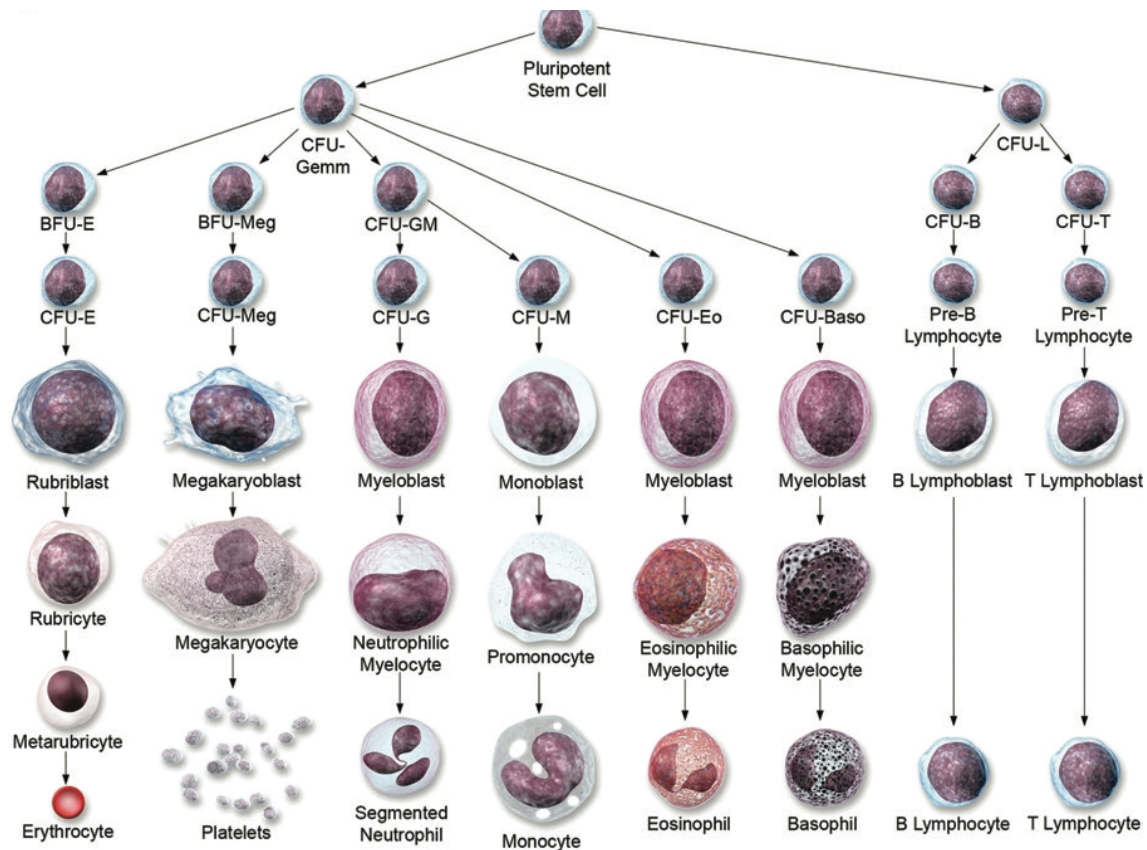


Figura 4. Representação da progressão da maturação das múltiplas linhagens celulares presentes na medula óssea. CFU = unidade formadora de colônia; E = eritróide; Meg = megacariócito; Gemm = granulocítico, eritróide, monócito-macrófago e megacariocítico; GM = granulócitos/monócitos; G = granulócitos; M = monócito; Eo = eosinófilo; Baso = basófilo; L = linfócito. Fonte: Travlos GS. Normal structure, function, and histology of the bone marrow. Toxicol Pathol. 2006;34(5):548-65.

O uso de álcool afeta a atividade da enzima ácido delta-aminolevulínico sintetase (ALA-S) (OHMORI et al., 1988). ALA-S é uma enzima mitocondrial que medeia uma etapa crítica na síntese de hemoglobina. A atividade reduzida dessa enzima resulta no acúmulo de ferritina nas hemácias as quais passam a ser denominadas de sideroblastos. Um a cada 3 pacientes alcoolistas contém sideroblastos na medula óssea (ANDREA; GRUNDY, 1988).

O consumo crônico de álcool também prejudica a absorção de ácido fólico presente na dieta (HALSTED, 1980) o que implica na capacidade proliferativa das células precursoras, explicando parcialmente, a frequência aumentada de células precursoras disfuncionais, denominadas megaloblastos, na medula óssea e níveis reduzidos de ácido fólico nas hemácias (S., HAROLD BALLARD, 1997).

Outro efeito intrigante do uso nocivo de álcool na medula óssea é a presença de vacúolos nas células precursoras mieloides. Apesar dessas observações terem sido feitas há mais de 50 anos ainda não está claro o mecanismo de vacuolização e como os vacúolos afetam as células e, conseqüentemente, a saúde de uma pessoa, porém sua presença em células precursoras mieloides é um indicador do efeito do consumo nocivo de álcool na medula óssea.

O aparecimento de vacúolos nos precursores de células linfoides pode ocorrer independentemente do consumo de álcool. Mesmo em indivíduos não alcoolistas bem nutridos, que substituíram o álcool por carboidratos enquanto mantêm uma dieta rica em proteínas, vitaminas e incluindo suplementos de ácido fólico, foram observados vacúolos na medula óssea. No entanto, experimentos *in vitro* revelaram que os vacúolos podem ser induzidos na medula óssea humana normal quando incubada em um meio nutriente contendo uma concentração crítica de álcool (62,5 mg/dl). Esses achados sugerem que o aparecimento de vacúolos é uma resposta ao estresse nutricional, tanto causado pelo excesso de carboidratos quanto pela ingestão de álcool (QUAYE et al., 1992)

Embora haja uma quantidade substancial de evidências sobre as complicações decorrentes do alcoolismo na medula óssea, como macrocitose, vacuolização dos precursores mieloides, eritropoiese megaloblástica e sideroblástica, trombocitopenia, redução da reserva de granulócitos da medula, hemólise e, em casos raros, hipoplasia da medula, o mecanismo pelo qual o metabolismo do etanol afeta a medula óssea ainda apresenta lacunas significativas (WICKRAMASINGLE; SLOVIER; SAUNDERS, 1981) (LATVALA; PARKKILA; NIEMELÄ, 2004; ZAKHARI, 2006) (QUAYE et al., 1992), (POST; DESFORGES, 1968; QUAYE et al., 1992), (POST; DESFORGES, 1968), (POST; DESFORGES, 1968), (LIU, 1973), (DOUGLASS; TWOMEY, 1970; PAFFENBARGER et al., 1994; ZIEVE, 1966) (BALLARD, 1980).

Há uma escassez de estudos mais recentes sobre o efeito do álcool na medula óssea. No entanto, informações relacionadas a essa temática pode ser obtida indiretamente em pesquisas que investigam o impacto do álcool na osteogênese. Esses trabalhos vêm mostrando que o consumo crônico de álcool prejudica a osteogênese devido a um efeito do álcool nas células-tronco mesenquimais da medula óssea (BMMSCs) levando essas células a um aumento na diferenciação adipogênica

e uma redução na diferenciação osteogênica gerando um aumento da adiposidade na medula óssea (CELLS, 2016; KAHLER-QUESADA et al., 2020; SOUSA et al., 2018).

Considerando a importância desse tecido na produção de diferentes tipos celulares que compõem o sistema imunológico e o potencial efeito imunomodulador do etanol no metabolismo celular das células imunes, investigar o impacto do metabolismo do álcool no metabolismo da medula óssea pode contribuir para a formulação de hipóteses sobre os mecanismos pelos quais o consumo crônico de álcool compromete a programação funcional do sistema imunológico.

1.5. Estudos metabolômicos

A metabolômica é uma disciplina que permite a identificação e análise do conjunto de metabólitos presentes em um determinado tecido, estabelecendo relações com fenótipos e auxiliando na formulação de hipóteses sobre processos fisiopatológicos através da análise metabolômica, é possível obter um panorama abrangente das moléculas envolvidas nos processos metabólicos de um tecido específico, proporcionando *insights* valiosos sobre as vias bioquímicas afetadas e os potenciais efeitos fisiológicos resultantes (ATHERSUCH, 2018).

Os estudos em metabolômica podem ser classificados em duas abordagens principais: direcionada (*targeted metabolomics*) ou não direcionada (*untargeted metabolomics*). Na abordagem direcionada, o objetivo é realizar uma análise quantitativa de um ou mais metabólitos específicos, que são selecionados previamente com base em sua relevância para uma classe química particular ou uma via metabólica específica. Por outro lado, a abordagem não direcionada da metabolômica tem como objetivo realizar uma análise qualitativa do maior número possível de metabólitos presentes em um sistema biológico em estudo. Nessa abordagem, não há uma pré-seleção dos metabólitos-alvo, mas sim uma exploração abrangente de diversas classes químicas de metabólitos. (Villas-Boas et al, 2007).

A metabolômica *untargeted* é uma ferramenta poderosa para estudos exploratórios, nos quais o objetivo principal é levantar hipóteses que possam ser posteriormente testadas por meio de estudos metabolômicos *targeted* ou validações funcionais (DI MINNO et al., 2021).

Devido à grande variedade de estruturas e propriedades químicas dos metabólitos, bem como à rápida resposta do metabolismo celular a mudanças no microambiente, os estudos metabolômicos requerem um fluxo de trabalho meticoloso, levando em consideração o tipo de amostra a ser investigada e o objetivo do estudo. Isso é essencial para definir as plataformas analíticas e os parâmetros que serão utilizados (JEPPESEN; POWERS, 2023).

As plataformas analíticas de separação mais comumente empregadas nos estudos metabolômicos são a cromatografia gasosa (GC, *do inglês, gas chromatography*) e a cromatografia líquida de alta eficiência (LC, *do inglês, liquid chromatography*) acopladas à espectrometria de massas (MS, *do inglês, mass spectrometry*). Essas técnicas fornecem informações sobre uma ampla variedade de classes químicas e, portanto, são amplamente utilizadas. Além disso, a eletroforese capilar acoplada ao espectrômetro de massas (CE-MS) e a ressonância magnética nuclear (NMR) também são empregadas (CANUTO et al., 2018).

A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) é utilizada para a separação e identificação de metabólitos voláteis ou volatilizáveis. Embora seja uma técnica robusta e reprodutível, a detecção de muitos metabólitos requer o processo de derivatização para torná-los voláteis. A derivatização é um processo que envolve manipulação considerável da amostra e períodos relativamente longos de incubação, o que pode introduzir erros devido à perda de metabólitos durante o processo. Para minimizar esse efeito, são utilizadas replicatas técnicas, mas isso limita o número de amostras que podem ser trabalhadas em conjunto (MOROS et al., 2017). Apesar disso, o GC-MS apresenta uma grande vantagem, pois já existem bibliotecas de espectros que facilitam a identificação dos metabólitos com base na combinação do tempo de retenção e do padrão de fragmentação obtido devido à ionização por elétrons (CANUTO et al., 2014).

A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) também é uma técnica robusta, sensível e seletiva. É considerada uma abordagem abrangente em relação à classe de compostos a serem analisados, pois permite a utilização de uma variedade de fases estacionárias e modos de separação, como a eluição em fase reversa, interação hidrofílica e troca iônica. Além disso, é uma técnica de fácil operação que requer menos manipulação da amostra (CANUTO et al., 2018).

A cromatografia por Eletroforese Capilar-Espectrometria de Massas (CE-MS) é uma técnica que permite a separação de compostos iônicos polares, com alta resolução e um tempo de análise curto. Uma vantagem dessa técnica é a possibilidade de realizar estudos metabolômicos em amostras biológicas relativamente pequenas, devido ao uso de volumes de injeção na ordem de nL. No entanto, essa técnica apresenta limitações em termos de sensibilidade e repetibilidade. A sensibilidade é prejudicada devido à diluição das amostras pelo uso de líquido auxiliar no acoplamento com MS. A CE-MS tem sido amplamente utilizada em complementaridade com LC-MS e GC-MS (CANUTO et al., 2018).

A Ressonância Magnética Nuclear (NMR) também é uma ferramenta eficiente em estudos metabolômicos, fornecendo informações sobre diversas classes químicas. A NMR apresenta como vantagem o fato de não exigir a manipulação da amostra, o que permite a análise de amostras biológicas intactas. Além disso, requer uma quantidade mínima de amostra e não inviabiliza o uso posterior da mesma. No entanto, a baixa sensibilidade e seletividade da NMR podem comprometer a identificação interpretação dos dados (CANUTO et al., 2018).

Dada a variedade de metabólitos e as vantagens e limitações das diferentes plataformas, a análise em multiplataforma tem sido amplamente utilizada para obter a maior diversidade de metabólitos. Isso porque uma maior cobertura em termos de substâncias químicas detectadas possibilita um melhor entendimento biológico do organismo estudado (LU et al., 2017; VILLAS-BÔAS; BRUHEIM, 2007).

O alcoolismo tem sido objeto de estudos metabolômicos (HARRIGAN; MAGUIRE; BOROS, 2008). Em sua maioria o objetivo tem sido encontrar potenciais biomarcadores para diagnóstico, estadiamento e avaliação da gravidade doença hepática alcoólica (ALD), especialmente da hepatite alcoólica (ANDRÉS-IGLESIAS et al., 2014; MANNA et al., 2010) e tratamento da dependência (HINTON et al., 2017).

No entanto, até o momento, não foram encontrados estudos na literatura que abordem o tema do alcoolismo e o sistema imunológico por meio de uma abordagem metabolômica. Neste estudo de caráter exploratório, utilizamos as técnicas de GC-MS e LC-MS em uma análise não direcionada, a fim de abranger o maior número possível de metabólitos nas células da medula óssea de camundongos tratados e não tratados com etanol. O fluxograma de trabalho utilizado neste estudo é apresentado na figura 5.

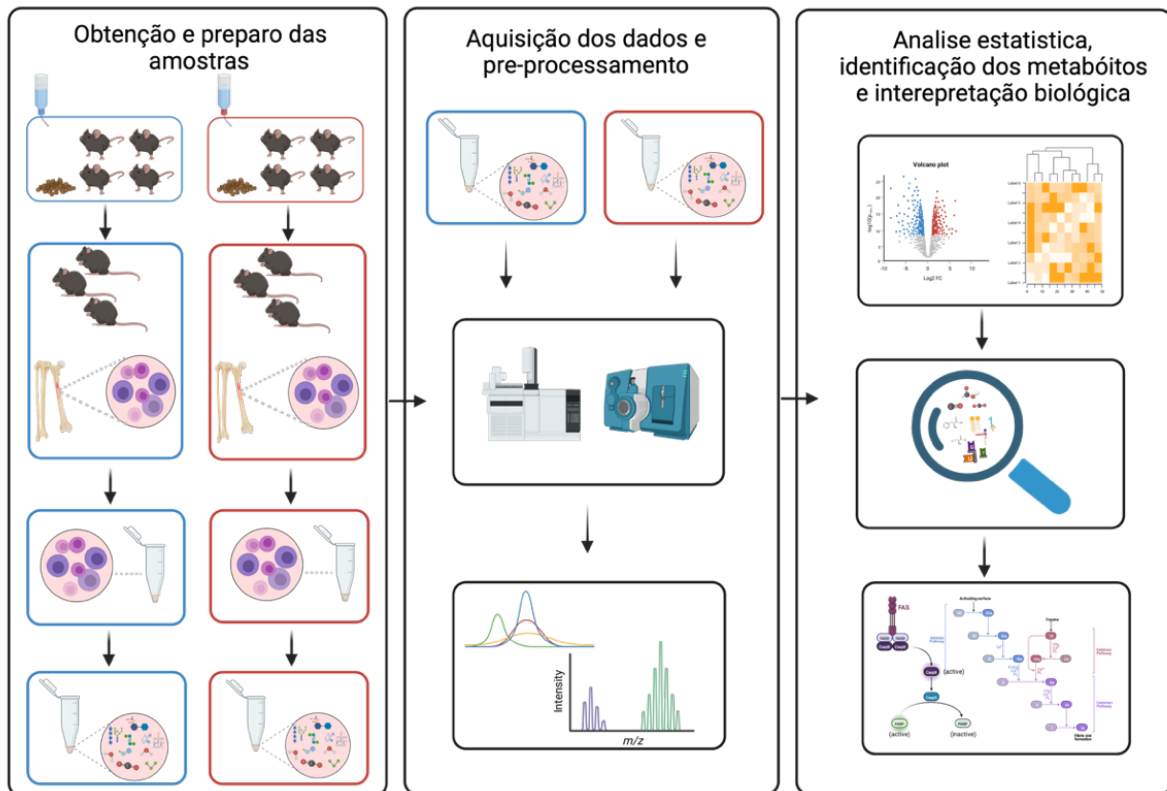


Figura 5. Fluxograma de trabalho da abordagem metabolômica. A obtenção das amostras constitui a primeira etapa do fluxograma. Nessa etapa as amostras foram obtidas a partir do pool celular da medula óssea de 3 camundongos C57Bl/6 machos. Foi realizado o *queenching* metabólico e os metabolitos foram extraídos. A segunda etapa do fluxograma consiste em aquisição dos dados, os quais foram obtidos por LC-MS e GC-MS e pré-processamento das amostras. A terceira e ultima etapa é composto pela análise estatística, identificação dos metabólitos e interpretação biológica. Criado com biorender.com

2. JUSTIFICATIVA

O consumo crônico de álcool compromete o sistema imunológico de indivíduos com alcoolismo, aumentando sua vulnerabilidade a infecções. Isso ocorre devido aos efeitos do etanol e seus metabólitos nas células do sistema imunológico. A medula óssea desempenha um papel crucial na produção de células imunológicas. A oxidação preferencial do etanol em relação a outras fontes de energia afeta o metabolismo celular. Uma vez que alterações metabólicas tem uma relação direta com a programação funcional das células do sistema imunológico, investigar como o metabolismo do etanol pode afetar a medula óssea em condições de consumo crônico de etanol pode ajudar a preencher lacunas no conhecimento sobre os mecanismos pelos quais o consumo crônico de álcool compromete a resposta imune em condições de alcoolismo.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar se o consumo crônico de etanol afeta o microambiente da medula óssea promovendo alterações no metaboloma deste tecido.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar os metabólitos presentes na medula óssea de camundongos tratados e não tratados com etanol por meio de GC-MS e LC-MS;
- Identificar vias metabólicas relacionadas aos metabólitos identificados;
- Propor hipóteses a respeito das vias metabólicas identificadas e a programação funcional da resposta imune

4. METODOLOGIA

4.1. Animais Experimentais

O presente projeto foi submetido a avaliação pelo CEUA (Comissão de Ética no Uso de Animais) da UFMG sob o número do protocolo 337 / 2018. Os animais foram distribuídos em dois grupos. O grupo H₂O, o qual recebeu água durante todo o tratamento e o grupo EtOH que recebeu o tratamento com etanol por 12 semanas. Cada grupo consistiu de 24 camundongos C57Bl/6 machos SPF (*specific pathogen free*). Eles foram mantidos em no máximo 4 animais por gaiola e em condições de temperatura e luz controladas. Foram acompanhados diariamente a disponibilidade de ração e água ou de ração e solução alcoólica.

4.2. Modelo animal de tratamento crônico com etanol

Foi seguido o modelo murino de consumo crônico de etanol (EtOH) padronizado por Yeligar e colaboradores (2012). Este modelo reproduz os níveis de álcool no sangue após o consumo crônico em indivíduos humanos. O álcool etílico foi disponibilizado exclusivamente para os animais em solução aquosa contendo EtOH durante 12 semanas. Os camundongos passaram por um período de aclimatação e adaptação à ingestão de EtOH. Foi disponibilizado exclusivamente a solução etanol a 5% (v/v) na primeira semana, 10% (v/v) na segunda a 20% (v/v) por 10 semanas (Yeligar, Harris, Hart, & Brown, 2012).

4.3. Obtenção das amostras

As células provenientes da medula óssea após o tratamento dos animais foram obtidas através da lavagem do fêmur e tibia seguida por lise das hemácias, *quenching* metabólico por resfriamento em banho de gelo seco e álcool comercial 70%, lavagem do pellet por 3 vezes com PBS 1X e contagem das células. Amostras contendo de 1×10^7 células foram centrifugadas a 1200rpm por 10 minutos, todo o sobrenadante foi retirado e o pellet de célula completamente seco foi armazenado em freezer -80 C para posterior extração dos metabólitos.

Para garantir que o parâmetro número de células não seja um viés metodológico para a abordagem metabolômica, primeiramente foi avaliado se o tratamento com etanol afeta o tamanho das células da medula óssea. Para isso, as células obtidas como descrito acima foram submetidas a análise de citometria de fluxo no citômetro FACScan e análise de tamanho e granulosidade FSC vs. SSC utilizando o software FlowJo (Tree Star, Ashland, OR, EUA).

4.4. Extração dos metabólitos

Foram utilizados dois solventes de extração: (i) Metanol absoluto e uma (ii) solução composta por metanol: clorofórmio: água 1:3:1 (v/v/v). Os resultados obtidos a partir da utilização de cada um dos solventes foram denominados de corrida 1 e corrida 2 respectivamente. As amostras foram levadas ao agitador tipo vórtex por 2 minutos, quatro ciclos de congelamento e descongelamento utilizando nitrogênio líquido seguido por banho seco e centrifugação por 10 minutos, 16.000 g a 4°C. Todo o sobrenadante foi transferido para um tubo tipo Eppendorf e completamente seco no concentrador a vácuo, *SpeedVac* a 35°C. As amostras foram ressuspendidas em 400 µL de metanol absoluto e analisadas.

4.5. Análise cromatográfica

As análises dos metabólitos extraídos a partir dos dois tipos de extração foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) (marca Agilent modelo Infinity 1260) acoplado ao espectrômetro de massas de alta resolução do tipo Q-TOF da marca Agilent® modelo 6520 B com fonte de ionização por electrospray (IES). Os parâmetros cromatográficos foram: coluna Agilent modelo Poroshell C-18, 3 mm de diâmetro interno, 10 cm de comprimento, partículas de 2,7 µm, a fase móvel: água acidificada com ácido fórmico (0,1% vv-1) (A) e metanol (B), com o gradiente: 10% de B (0 min), 98% de B (0-10 min); 98% de B (10-17 min). Os parâmetros de ionização foram: pressão do nebulizador de 20 psi, gás secante a 8 L/min a uma temperatura de 220°C e no capilar foi aplicado uma energia de 4,5 kV. Amostras extraídas utilizando a solução de Metanol: Clorofórmio: água 1:3:1 (v/v/v) foram analisadas também por Cromatografia a Gás acoplado ao Espectrômetro de massa.

Os detalhes da metodologia utilizada para a análise metabolômica por GC-MS estão apresentadas na sessão de resultados no formato de artigo. A seguir estão apresentadas as etapas metodológicas para a abordagem por LC-MS.

4.6. Tratamento dos dados

Os dados brutos obtidos pela LC-MS foram convertidos para *.mzData no software ms convert. A extração da matriz e processamento dos dados foram realizados no software XCMS (versão 1.24.1). Inicialmente, realizou-se uma otimização dos parâmetros de processamento e extração da matriz de dados utilizando o pacote IPO (Isotopologue Parameter Optimization, versão 1.16.0) usando as amostras de controle de qualidade (QC *do inglês quality controls*) para encontrar as melhores condições de processamento através do software R studio versão 2021.19.1 (2009-2021). Os parâmetros otimizados utilizando o método "centwave" foram: snthresh = 10 para ambas corridas prefilterpeaks= 3 para ambas corridas, largura do pico cromatográfico (min, máx) – peakwidth= 13.6 a 80 segundos para a corrida 1 e 11.65 a 89 para corrida 2, erro de massa = 22 ppm para corrida 1 e 28 para corrida 2, mzwid = 0,306 para corrida 1 e 0,0222 para corrida 2, profStep (binSize)= 0768 para corrida 1 e 0.6964 para corrida 2, bw= 0.88 para ambas corridas, minfrac= 1 para ambas corridas, maxgroup=50. Na correção de tempo de retenção (retcor), o método utilizado foi o default do "obiwarp" e a faixa de tempo de análise foi 10 minutos.

O n amostral consistiu em 8 amostras por grupo, resultantes do pool de células provenientes de 3 animais. Cada amostra apresentava a média de intensidade do referido *molecular features*. Os dados foram exportados e convertidos em .CSV. Primeiramente, foi feita a transformação dos dados em \log_2 e em seguida a remoção dos valores ausentes (*missing values*) aplicando o filtro de 70% em pelos menos um dos grupos utilizando o software Perseus versão 1.6. As análises estatísticas foram realizadas MetaboAnalyst 5.0. Inicialmente os dados foram normalizados seguindo os parâmetros soma e escalonamento de pareto e então submetidos à Análise de Componentes Principais (PCA *do inglês Principal Component Analysis*) e análise discriminante por mínimo quadrados parciais (PLS-DA *do inglês: Partial Least Squares-Discriminant Analysis*) com predição de QCs. Molecular features

discriminantes foram selecionados nos modelos de PLS-DA através do gráfico de *Variable Importance Projection* (VIP), sendo selecionados aqueles com VIP score > 1.

A busca pelos possíveis metabólitos para identificação dos *molecular features* estatisticamente significativos foi realizada através da busca dos m/z's médio em base de dados públicas como o *Human Metabolome Database* (HMDB), *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG), *PubChem* e *METLIN Metabolite and Chemical Entities Database*, *Chemical Entities Database of Biological Interest* (ChEBI), e *Lipid Maps* através da plataforma *CEU Mass Mediator* utilizando modo positivo como modo de ionização, M+H, M+2H, M+Na, M+K, M+NH₄ e M+H-H₂O como possíveis aductos e erro de massa máximo 22 e 28ppm para corrida 1 e corrida 2 respectivamente.

5. RESULTADOS

5.1. Capítulo 1 – Análise metabolômica de células da medula óssea de camundongos tratados e não tratados com etanol por Cromatografia a Gás acoplada ao Espectrômetro de Massas.



OPEN ACCESS

EDITED BY
Samantha Yeligar,
Emory University, United StatesREVIEWED BY
Liz Simon,
Louisiana State University, United States
Rachel McMahan,
University of Colorado Anschutz Medical
Campus, United States*CORRESPONDENCE
Frederico Marianetti Soriani
✉ fredsori@icb.ufmg.brSPECIALTY SECTION
This article was submitted to
Nutritional Immunology,
a section of the journal
Frontiers in ImmunologyRECEIVED 20 December 2022
ACCEPTED 06 March 2023
PUBLISHED 05 April 2023CITATION
Pontes Pereira TT,
Fideles Duarte-Andrade F,
Gardone Vitorio J, do Espírito
Santo Pereira T, Braga Martins FR,
Marques Souza JA, Malacco NL,
Mathias Melo E, Costa Picossi CR, Pinto E,
Santiago Gomez R, Martins Teixeira M,
Nori de Macedo A, André Bautista Canuto G
and Marianetti Soriani F (2023) Chronic
alcohol administration alters metabolomic
profile of murine bone marrow.
Front. Immunol. 14:1128352.
doi: 10.3389/fimmu.2023.1128352COPYRIGHT
© 2023 Pontes Pereira, Fideles Duarte-
Andrade, Gardone Vitorio, do Espírito Santo
Pereira, Braga Martins, Marques Souza,
Malacco, Mathias Melo, Costa Picossi, Pinto,
Santiago Gomez, Martins Teixeira, Nori de
Macedo, André Baptista Canuto and
Marianetti Soriani. This is an open-access
article distributed under the terms of the
[Creative Commons Attribution License
\(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or
reproduction in other forums is permitted,
provided the original author(s) and the
copyright owner(s) are credited and that
the original publication in this journal is
cited, in accordance with accepted
academic practice. No use, distribution or
reproduction is permitted which does not
comply with these terms.

Chronic alcohol administration alters metabolomic profile of murine bone marrow

Tássia Tatiane Pontes Pereira¹, Filipe Fideles Duarte-Andrade²,
Jéssica Gardone Vitorio², Taiane do Espírito Santo Pereira³,
Flavia Rayssa Braga Martins¹, Jéssica Amanda Marques Souza¹,
Nathália Luisa Malacco⁴, Eliza Mathias Melo⁵,
Carolina Raíssa Costa Picossi⁶, Ernani Pinto⁷,
Ricardo Santiago Gomez², Mauro Martins Teixeira⁵,
Adriana Nori de Macedo⁸, Gisele André Baptista Canuto³
and Frederico Marianetti Soriani^{1*}¹Department of Genetics, Ecology and Evolution, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, ²Department of Clinic, Pathology and Dental Surgery, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, ³Department of Analytical Chemistry of the Institute of Chemistry, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil, ⁴Department of Microbiology and Immunology, McGill University, Montreal, QC, Canada, ⁵Department of Biochemistry and Immunology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, ⁶Chemistry Institute, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, ⁷Nuclear Energy Center in Agriculture, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, University of São Paulo, Piracicaba, Brazil, ⁸Chemistry Department, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil**Introduction:** People with hazardous alcohol use are more susceptible to viral, bacterial, and fungal infections due to the effect of alcohol on immune system cell function. Metabolized ethanol reduces NAD⁺ to NADH, affecting critical metabolic pathways. Here, our aim was to investigate whether alcohol is metabolized by bone marrow cells and if it impacts the metabolic pathways of leukocyte progenitor cells. This is said to lead to a qualitative and quantitative alteration of key metabolites which may be related to the immune response.**Methods:** We addressed this aim by using C57BL/6 mice under chronic ethanol administration and evaluating the metabolomic profile of bone marrow total cells by gas chromatography–coupled mass spectrometry (GC–MS).**Results:** We identified 19 metabolites. Our data demonstrated that chronic ethanol administration alters the metabolomic profile in the bone marrow, resulting in a statistically diminished abundance of five metabolites in ethanol-treated animals: uracil, succinate, proline, nicotinamide, and tyrosine.**Discussion:** Our results demonstrate for the first time in the literature the effects of alcohol consumption on the metabolome content of hematopoietic tissue and open a wide range of further studies to investigate mechanisms by which alcohol compromises the cellular function of the immune system.

KEYWORDS

alcoholism, bone marrow, metabolome, cell function, metabolites, immune system

1 Introduction

Alcohol use disorder (AUD) is characterized by an impaired ability to stop or control alcohol use, despite adverse social, occupational, or health consequences. AUD is one of the most common psychiatric disorders and is a leading cause of mortality worldwide (1).

Considerable evidence indicates that alcohol abuse results in clinical abnormalities of the immune system (2, 3). Hematopoietic stem cells differentiate into myeloid progenitor cells, which are the precursor cells of granulocytes, the major type of phagocyte, constituting the front line of innate immune defense (4, 5).

Multiple lines of clinical and experimental evidence demonstrate that chronic alcohol consumption is linked to increased risks of infections, such as pneumonia. This effect has been related to alcohol's effect on the immune system (6, 7), such as alterations in the production of bone marrow immune cells and impairment of their effector functions (3, 5).

Although there is a vast literature describing the effect of alcohol on the immune system (2, 3), there is a limitation in our understanding of the effect of alcohol on the bone marrow, and it is not known whether the cells of this system are affected by alcohol in the bloodstream or if this deleterious effect occurs inside the bone marrow microenvironment.

The majority of ingested alcohol is metabolized in the liver by hepatocytes, but immune cells such as macrophages and neutrophils can also metabolize it (8). Regardless of cell type, alcohol metabolism involves the action of alcohol dehydrogenase (ADH) and aldehyde dehydrogenase (ALDH2). The ADH enzyme is present in the cytoplasm of cells and is responsible for the oxidation reaction of ethanol that results in acetaldehyde. ADH2 is present in the mitochondria and converts acetaldehyde to acetate. These reactions involve the reduction of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD^+) to NADH, increasing the $\text{NADH} : \text{NAD}^+$ ratio, and leading to a cellular environment vulnerable to damages caused by metabolites and adducts from ethanol metabolism and reactive oxygen species (ROS) (9).

The $\text{NADH} : \text{NAD}^+$ ratio is an important parameter for the maintenance of several metabolic enzymes, and its disbalance is known to disturb cell metabolism (10), such as decreased glycolysis (11), decreased Krebs cycle (12, 13), and decreased gluconeogenesis (13, 14).

Immune cells have distinct metabolic configurations that allow them to balance energy demands and molecular biosynthesis. However, beyond that, it is now becoming clear that cellular metabolism has direct roles in regulating immune cell function, and disturbances in these metabolic configurations limit the functionality of these cells (15–17). The field of immunometabolism has advanced our understanding of how cell metabolism plays a central role in cell function, such as phagocytosis, ROS production, cell differentiation/maturation, and consequent host defenses (18–20).

In this study, we applied a metabolomic approach using gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) to characterize metabolic changes in the bone marrow microenvironment to test the hypothesis that alcohol could change metabolic pathways in the bone marrow and leukocyte progenitor cells, leading to a qualitative

and quantitative alteration of metabolites that may be directly or indirectly related to the immune response.

We obtained a snapshot of the distinct changes in the metabolite composition of bone marrow cellular content in mice chronically exposed to ethanol. The identified metabolites suggest that chronic alcohol consumption would disrupt several metabolic pathways, such as glycolysis, the Krebs cycle, and amino acid synthesis, that could interfere with immune cell function.

Our results represent the first step toward understanding the dysfunction of the immune system due to alcohol consumption because of bone marrow microenvironment alteration of metabolite content.

2 Methods

2.1 Ethics statement and mouse model of chronic ethanol consumption

Animal experiments received approval from the Animal Ethics Committee (CEUA) of the Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Brazil (Protocol 337/2018), which is in accordance with Brazilian guidelines (CONCEA) and international standards. Six-week-old male C57BL/6J mice were divided into EtOH and H_2O groups and maintained in specific pathogen-free conditions. Animals in the EtOH group received ethanol at a rate of 5% (v/v) in the first week, followed by 10% (v/v) in the second week, and were treated for 10 weeks with 20% (v/v) of ethanol in their drinking water. The H_2O group received water. This model, standardized by Yeligar et al. (21), generates similar blood alcohol levels to those observed in humans under chronic consumption.

2.2 Sample preparation for flow cytometry

Bone marrow was harvested from the femurs of six animals in each group using 0.5% BSA in 1× phosphate buffered saline (PBS). A sample for the ethanol group was lost during analysis. Total bone marrow cells were subjected to hypotonic lysis to remove residual erythrocytes. The samples were filtered in a 40 μm cell strainer, centrifuged, resuspended in 0.5% BSA in 1× PBS, fixed with 1× PBS solution containing 4% formaldehyde for 20 min, and then the cells in 0.5% BSA in 1× PBS were subjected to flow cytometry analysis on the FACSCanto II cytometer (Becton Dickinson). The relevant population was gated using accepted criteria for cell complexity and size, excluding debris and singlets (Supplementary Figure 1). FSC and SSC plots were assessed using FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR, USA). Graphing and statistical analyses were performed using GraphPad Prism 8. Differences between different groups were analyzed by a student t-test.

2.3 Sample preparation for GC–MS

Approximately 3×10^7 total bone marrow cells were obtained from three animals pooling samples for each group (H_2O and

EtOH) ($n = 8$ pools per group). Bone marrow was harvested from the femur and tibia using phosphate buffered saline (PBS). Red blood cells were lysed by osmotic shock. Metabolic quenching was performed using a cooling bath (dry ice/alcohol), and samples containing 1×10^7 cells were centrifuged for 10 min at 225g at 4°C, and the completely dry cell pellet was stored in a -80°C freezer for further extraction of metabolites.

2.4 Metabolite extraction and GC–MS system

Metabolite extraction was performed according to modifications to the protocol described by Canuto et al. (22). Technical replicates of 1×10^7 bone marrow cells were produced. Metabolites were extracted with 300 μl of extraction solvent containing methanol:chloroform:water 1:3:1 (v/v/v) followed by 2 min in a vortex mixer, four cycles of freezing and thawing in liquid nitrogen, and centrifugation for 10 min at 16,000g at 4°C. The entire supernatant was transferred to the glass insert and completely dried in the vacuum concentrator SpeedVac at 35°C.

Methoximation was performed by adding 20 μl of methoxyamine to pyridine (15 mg/ml). The vials were placed in an ultrasound bath for 10 s, followed by vigorous vortexing for 10 s. The samples were then incubated for 90 min at room temperature and protected from light. For silylation, 20 μl of BSTFA with 1% TCMS were added. The samples were again subjected to an ultrasound bath for 10 s, followed by vigorous vortexing for 10 s. The reaction was processed in a thermostatic bath for 30 min at 40°C. Finally, 100 μl of heptane containing an internal standard (methyl tridecanoate) was added to each sample.

Samples, QCs (quality controls), and a blank were derivatized according to the protocol described above. Samples were analyzed randomly, and QCs were analyzed at the beginning, every five samples, and at the end of the analytical sequence.

For the construction of the identification library, data were corrected for the retention times of hydrocarbon patterns (FAME MIX). Metabolites detected in the blank were removed from the final result.

The analyses were performed in a gas chromatography system (model 5975C, Agilent Technologies) coupled to a quadrupole mass spectrometer (model 7890A, Agilent Technol). A HP5-MS column (30 m, 0.25 i.d., 0.25 mm film, 95% dimethyl/5% diphenylpolysiloxane—Agilent Technologies) was used to perform the separation of the metabolites. High-purity helium was used as a mobile phase at a 1 ml/min flow rate. The injector was maintained at 250°C, and samples were injected with a 1:10 split at 10 ml/min of He. The oven was initially set at 60°C and held for 1 min, and the temperature increased to 300°C at 10°C/min, resulting in 25 min of run time.

The MS was operated in scan mode (50–600 m/z). An electron impact ionization source was placed at -70 eV. Detector transfer line, source filament, and quadrupole temperatures are maintained at 290, 230, and 150°C, respectively. Operation and data acquisition using Qualitative Analysis Mass Hunter B05.00 (Agilent Technologies) software.

2.5 GC–MS data processing and statistical analysis

Raw data were converted to *.mzData in Qualitative Analysis software (B.05.00, Agilent Technologies), and the profiles were checked for outlier removal. An optimization of data extraction and processing parameters was performed using the IPO package (isotopologue parameter optimization, version 1.16.0), using QC samples to find the best conditions. Data processing was performed in XCMS software (version 1.24.1) running on the R platform (version 3.2.3, R Core Team). The optimized parameters were as follows: “Matched Filter” method for peak detection using peak width (fwhm) = 7.2, signal/noise ratio (snthresh) = 1.0, minimum difference between m/z 's for overlapping peaks (mzdiff) = 0.36, and maximum number of peaks per extracted ion chromatogram (max) = 5. The grouping step used bandwidth correction (bw) = 0.9, width of overlapping bands of m/z (mzwid) = 0.061, minimum number of samples needed in at least one of the sample groups to be a valid group (minsamp) = 1, minimum fraction of detected samples (minfrac) = 0.5, and maximum number of peaks per extracted ion chromatogram (max) = 50 (in the first and second groupings). Alignment using retention time correction was performed using the “obiwarp” method. FillPeaks were applied to remove missing values, and the extracted molecular features (m/z ratios, retention times, and intensities) were normalized before statistical analysis. The raw data matrix consisted of eight samples per group, with each sample presenting the average intensity of the referred molecular feature.

Multivariate statistical analyses were performed on the MetaboAnalyst 5.0 platform, in which the data matrix of identified metabolites was normalized by the internal standard, C13 methyl tridecanoate (m/z 74, RT 13.73 min), and log transformation and Pareto scaling were also applied. To evaluate instrumental stability, principal component analysis (PCA) was applied, followed by partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) to indicate metabolite differences between groups (ethanol vs. control), in which a VIP score >1.0 from PLS-DA was used to select discriminants.

2.6 Metabolite annotation

Metabolite annotation was performed in AMDIS (Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System) software using the Fiehn RT Library. Metabolites were annotated based on retention time and mass spectral fragmentation pattern. To do that, retention indexing followed by retention time analysis were performed. The annotated metabolites were then correlated with the raw data matrix extracted from XCMS.

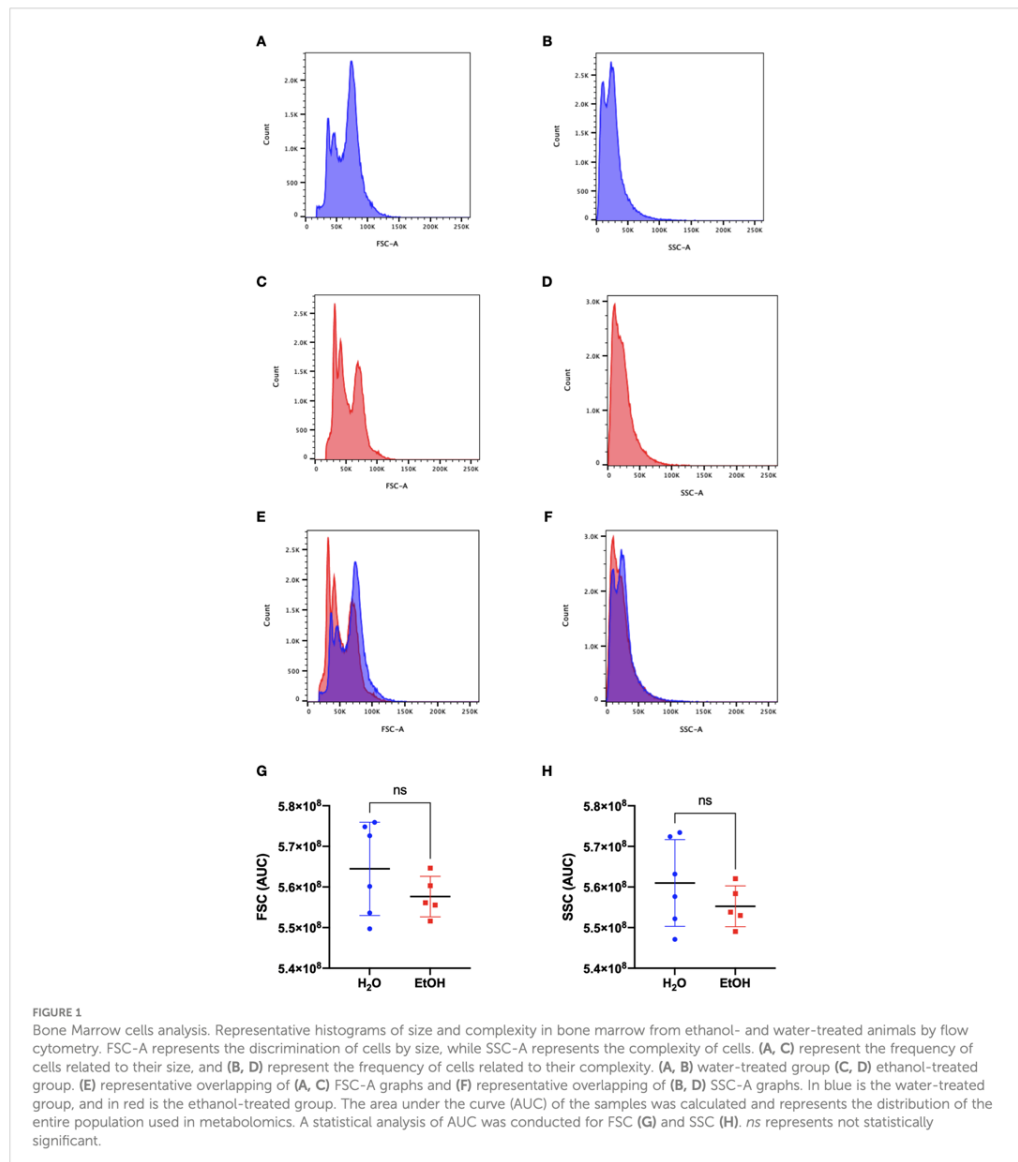
3 Results

3.1 Chronic ethanol consumption does not affect the size and complexity of the bone marrow cells from mice

To assess whether cell number is a suitable parameter for normalization of samples in the study, we evaluated the general

profile of cells by flow cytometry using the complexity (SSC-A) and size (FSC-A) parameters. The gating strategy was able to select around 91% of total bone marrow cells in both experimental groups (Supplementary Figure 1). Figures 1A, B show representative FSC-A and SSC-A histograms from water-treated animals, while Figures 1C, D show representative FSC-A and SSC-A histograms from ethanol-treated animals. Overlapping the histograms (FSC-A

in Figure 1E and SSC-A in Figure 1F) demonstrates similar distributions of cells in each parameter. To quantify the distribution of sizes and complexities of cells in both groups, we analyzed the area under the curve (AUC) and the results demonstrated that ethanol treatment did not change the distribution of cell sizes (Figure 1G) or cell complexities (Figure 1H) in the bone marrow.



3.2 Chronic alcohol consumption alters the metabolomics profile in the bone marrow

Gas chromatography–coupled mass spectrometry was performed using pooled bone marrow cells. After carrying out the identification processes in AMDIS, correlation with the matrix extracted from XCMS, and removal of the analytes present in the blank, our approach was effective in identifying 19 metabolites (Table 1) that were classified into six different Gene Ontology classes: amino acids, organoheterocyclic compounds, monosaccharides, organic acids, and fatty acids alcohols/polyols (Figure 2). Metabolites 3 and 17 present two possibilities for identification.

To evaluate the instrumental performance, principal component analysis (PCA) (Figure 3A) and partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) (Figure 3B) was applied, including the QC samples. The supervised model (PLS-DA) was validated using a distance separation method with 100 permutations, considering a p-value of ≤ 0.05 . It is possible to observe an excellent group of QCs demonstrating the quality and reliability of the instrument for data acquisition.

Moreover, to better identify and discriminate metabolites, a new model (PLS-DA) (Figure 3C) was conducted without the QC

samples, and a VIP score >1.0 (Figure 3D) was used to consider statistically significant differences in abundance of the metabolites between groups. Five metabolites were identified with statistical significance by multivariate analysis (uracil, L-tyrosine, L-proline, succinic acid, and nicotinamide).

Table 1 presents, in bold, the significantly altered metabolites between groups comparison, in which the statistical results (VIP score) and the variation rate fold change (FC) are presented. These five statistically different abundance metabolites are decreased in the ethanol-treated group at several intensities.

4 Discussion

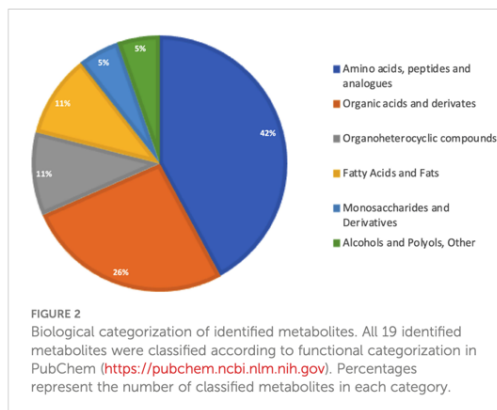
Metabolic profiles have been explored in many diseases (23), including liver diseases resulting from alcoholism (24–27). This study was the first to investigate the impact of chronic alcohol consumption on the bone marrow metabolic profile using an *in vivo* model of chronic ethanol consumption. The motivation for this study stems from evidence demonstrating that chronic consumption has negative effects on the ability of individuals with hazardous alcohol use to respond properly during infections (2, 28, 29).

TABLE 1 Metabolites identified by GC–MS analysis and statistically significant altered metabolites in bone marrow cell of ethanol-treated mice.

| Metabolite | VIP score | FC (EtOH/H ₂ O) | Chemical Classification |
|-------------------------|-------------|----------------------------|---|
| 1. Valine | 0.63 | 0.94 | Amino acids, peptides, and analogues |
| 2. Alanine | 0.99 | 0.97 | Amino acids, peptides, and analogues |
| 3. Leucine/isoleucine | 0.06 | 0.95 | Amino acids, peptides, and analogues |
| 4. Benzoic acid | 0.62 | 0.51 | Organic acids and derivatives |
| 5. Serine | 0.82 | 0.87 | Amino acids, peptides, and analogues |
| 6. Proline | 1.26 | 0.98 | Amino acids, peptides, and analogues |
| 7. Succinic acid | 1.38 | 0.89 | Organic acids and derivatives |
| 8. Uracil | 2.90 | 0.71 | Organoheterocyclic compounds |
| 9. Fumaric acid | 0.54 | 0.91 | Organic acids and derivatives |
| 10. Aspartic acid | 0.73 | 0.97 | Amino acids, peptides, and analogues |
| 11. Nicotinamide | 1.20 | 0.70 | Organoheterocyclic compounds |
| 12. Malic acid | 0.28 | 0.96 | Organic acids and derivatives |
| 13. Glutamic acid | 0.91 | 0.91 | Amino acids, peptides, and analogues |
| 14. Lauric acid | 0.28 | 0.87 | Organic acids and derivatives |
| 15. Tyrosine | 1.07 | 0.86 | Amino acids, peptides, and analogues |
| 16. Hexadecanol | 0.01 | 0.77 | Alcohols and Polyols, Other |
| 17. Mannitol/altrose | 0.64 | 1.16 | Monosaccharides and Derivatives |
| 18. Linoleic acid | 0.34 | 0.72 | Fatty Acids and Fats |
| 19. Oleic acid | 0.36 | 1.11 | Fatty Acids and Fats |

FC, Fold Change; VIP score, Variational Importance in Projection.

The metabolites present in lines 3 and 17 present two possible identifications. This is due to the analytical impossibility of differentiating these isomers as a function of elution at very close retention times and because they present identical MS fragmentation profiles. Therefore, the identification is presented with both isomers. Statistically significant altered metabolites that are present are shown in bold.



Analytical tools for metabolomics studies have high sensitivity, being able to identify and quantify the presence of analytes at low concentrations (30). Therefore, the first step of the present study was to evaluate, by flow cytometry, whether the parameter number of cells would be adequate, since alcohol could be causing an increase in cell size, resulting in a bias toward greater abundance of the metabolite. The descriptive evaluation obtained from the FSC, and SSC histograms showed that ethanol treatment does not cause changes in the size/volume of cells in the bone marrow, ensuring that the quantitative differences found in this study are because of alcohol on metabolic pathways, resulting in a distinct metabolic profile.

The negative effect of chronic ethanol consumption on the immune system and bone marrow has already been investigated. It is well established that the cells of the immune system of individuals affected by alcoholism have a lower capacity to migrate to the infectious site, phagocyte, and eliminate the pathogen, and the mechanism is often related to the production of cytokines and chemokines that have their levels and activities affected (21, 31–34). In the bone marrow, studies have shown that alcohol consumption promotes important effects on hematopoiesis (35, 36).

In this study, we evaluated the effect of ethanol on bone marrow at the level of metabolites. Once cellular metabolism plays an important role in the functionality of immune cells, changes in the metabolic profile can compromise their functionality (15).

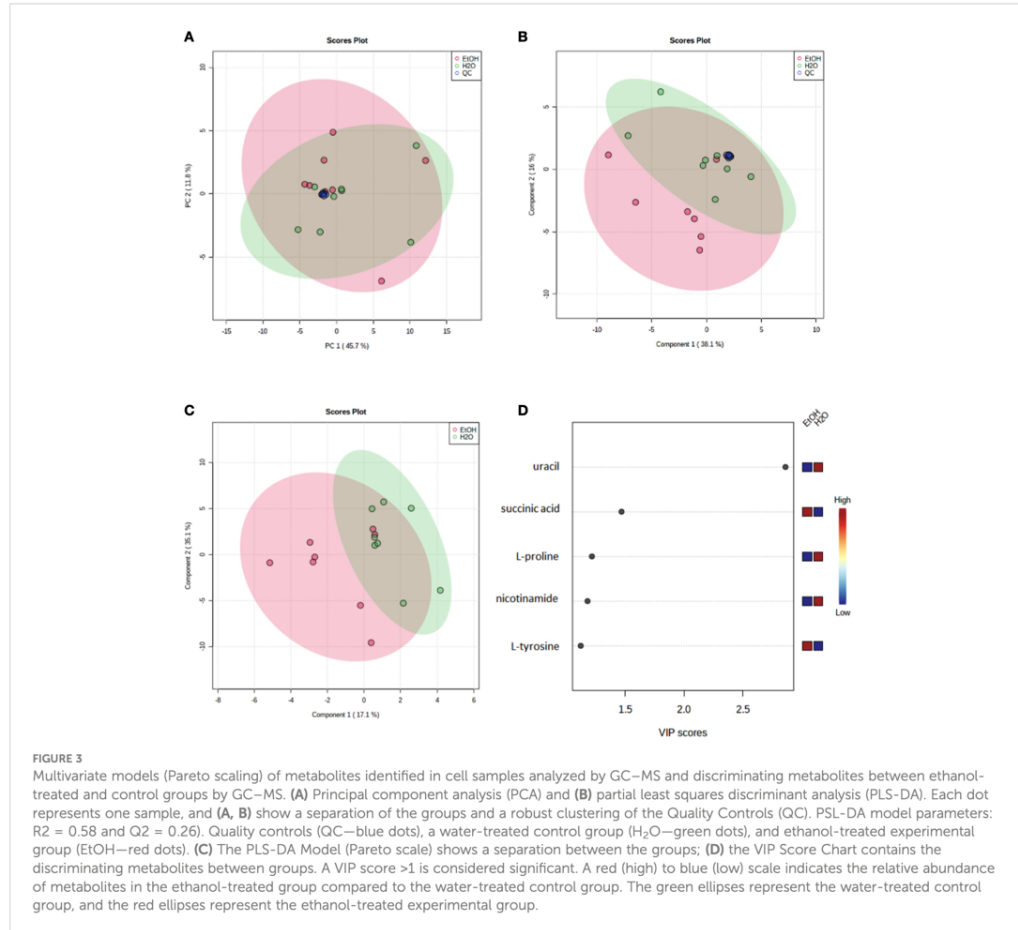
The metabolomics profile revealed significant effects of chronic alcohol consumption on the metabolome of mouse bone marrow. Although the analytical restrictions of the gas chromatography approach limit the scope of the study to volatile compounds and/or volatile compounds through derivatization, it was possible to obtain a holistic approach to the metabolic profile of this tissue as well as the changes resulting from chronic exposure to alcohol.

Nicotinamide ($C_6H_6N_2O$) showed reduced abundance in cells from animals under chronic treatment with ethanol. Nicotinamide is the active form of vitamin B3 and a component of the coenzyme nicotinamide adenine dinucleotide (NAD). When ethanol is metabolized, it generates a reduced cellular environment due to the use of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD^+) as an

enzymatic cofactor at both stages of its metabolism. The reduced cellular environment has been related to the dysfunctions observed in the cells of the immune system (2, 21, 37, 38). In addition, NAD^+ is an enzyme cofactor used in important metabolic pathways such as glycolysis and the Krebs cycle, which have been reported to be essential for neutrophil and macrophage function (15, 39, 40). We hypothesize that ethanol metabolism limits the availability of NAD^+ for cell metabolism, altering the metabolic profile. This alteration may be related to the negative effect of alcohol on the function of these cells. Our results suggest that this may be part of the mechanism by which alcohol alters metabolism in this tissue. Although functional studies are needed to confirm and elucidate this evidence.

Succinic acid, an important component of the TCA cycle, was recently identified as a modulator of the innate immune response. In lipopolysaccharide (LPS)-activated macrophages, succinate was identified as a key metabolite in innate immune response signaling since its increase is correlated to increased production of interleukin-1b during inflammation (41, 42). Furthermore, lipopolysaccharide-induced succinate stabilizes hypoxia-inducible factor (HIF-1 α), an effect that is inhibited by 2-deoxyglucose, with interleukin-1b as an important target (41, 43). HIF-1 α is an oxygen-dependent transcriptional activator that plays crucial roles in tumor angiogenesis and mammalian development (44). Furthermore, HIF-1 α increases macrophage aggregation, invasion, and motility and boosts the expression of pro-inflammatory cytokines. HIF-1 α also increases neutrophil survival by inhibiting apoptosis and triggering NF- κ B-dependent neutrophilic inflammation (45). Succinate was also shown to promote hematopoietic cell proliferation by phosphorylation of the ERK1/2 mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway and inositol phosphate accumulation in a pertussis toxin (PTX)-sensitive manner (46). Furthermore, succinate induced activation of ERK1/2, JNK, and p38 MAPK signaling pathways in immortalized retinal ganglion cells (RGC-5) cells in a dose-dependent manner (47). The ERK1/2 and MAPK pathways are related to the activation of the pro-inflammatory response of immune cells (48–50). Therefore, the deregulation in the amount of succinate found in this work can be considered a modulating mechanism of chronic alcohol consumption in the immune response.

In agreement with studies that investigated changes in the metabolome associated with alcohol consumption in humans, amino acids are the most representative chemical class (51). Tyrosine and proline are non-essential amino acids used in protein biosynthesis. Protein tyrosine (PTP) phosphorylation is an important post-translational modification that controls cell signaling involved in the regulation of a variety of biological processes, including cell growth, proliferation, differentiation, migration, survival, and death. The negative effect of downregulating these amino acids in the ethanol-treated group can impair an important biological process since tyrosine phosphorylation is considered one of the fundamental steps in signal transduction and regulation of enzymatic activity (52). However, studies that investigate the relationship between quantitative alterations of amino acids and the function of immune system cells were not found in the literature. The results



found here suggest that investigations in this direction may be promising for understanding the mechanism behind the harmful effect of alcohol on immune response. Once some amino acids like tyrosine can be catabolized all the way down into intermediaries of the Krebs cycle, especially into fumarate and acetoacetate (53).

Uracil is a common natural pyrimidine found in RNA and was found to be downregulated in the bone marrow of ethanol-treated mice. Despite not finding in the literature a direct relationship between this nucleotide and the function of immune cells, it is known that uracil helps to carry out the synthesis of many enzymes necessary for cell function through the interaction with ribose and phosphates and serves as an allosteric regulator and a coenzyme for many important biochemical reactions (54).

A wide variety of types of RNAs act in the regulation of the immune system. microRNAs, RNA-binding proteins that control the stability and translation of messenger RNA (mRNA) and RNA interference (RNAi) are examples of RNAs that act by controlling the gene expression of cytokines and chemokines responsible for

the intercellular communication of the immune system (55, 56). The decrease in uracil levels resulting from the chronic consumption of ethanol in the bone marrow may indirectly compromise the entire elaboration of the immune response.

Metabolic profiles can be considered a phenotypic state that undergoes variations under the influence of changes in the genome, proteome, transcriptome, metabolism, and modifications in the microenvironment where they are found (57). In our approach, we demonstrate for the first time that chronic ethanol consumption can alter the bone marrow microenvironment, and this can be associated with altered immune cell metabolism, leading to a programmed alteration function of the mature circulating cells. However, this is an initial, exploratory metabolomics study that brings important insights into cellular metabolism under alcohol exposure. We are aware of some limitations of our approach, such as the influence of animal gender in metabolism and susceptibility to alcohol, the use of other analytical platforms that should improve the number of identified metabolites, and the need for functional

studies to demonstrate the role of metabolic pathways in the immune response. In addition, the effects of blood alcohol concentration and the effects of the products of its metabolism (e.g., acetaldehyde) can also be considered. Complementary studies will allow greater coverage of the metabolome, in addition to confirming and validating the hypotheses raised in this work.

Data availability statement

The original contributions presented in the study are included in the article/**Supplementary Material**. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

Ethics statement

The animal study was reviewed and approved by Animal Ethics Committee (CEUA) of Universidad Federal de Minas Gerais (UFMG), Brazil (Protocol 337/2018) which are in accordance to the Brazilian guidelines (CONCEA) and international standards.

Author contributions

Conception of the study: FS. Designed the experiments: TP, FA, JV, and FS. Performed the experiments: TP, JS, FM, CP, and EP. Interpretation of the results and data analysis: TP, TS, GC, AM, NM, and FS. Contributed reagents/materials/analysis tools: MT, FS, and RG. Wrote the manuscript: TP and FS. Helped in animal experiments: EM. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Funding

This work was supported by the Pró-Reitoria de Pesquisa at the Universidade Federal de Minas Gerais, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (474528-2012-0 and 483184-2011-0), and the Fundação de Amparo à Pesquisa do

Estado de Minas Gerais (APQ- 01756-10; APQ-02198-14; APQ-03950-17; and APQ-01899-18). This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brasil (CAPES)—Finance Code 001 and the Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Dengue e Interação Microorganismo Hospedeiro (INCT em Dengue). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Acknowledgments

We would like to thank the Universidade Federal de Minas Gerais for the opportunity to develop this work. We are thankful to Ilma Marçal S. and Rosemeire A. Oliveira.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2023.1128352/full#supplementary-material>

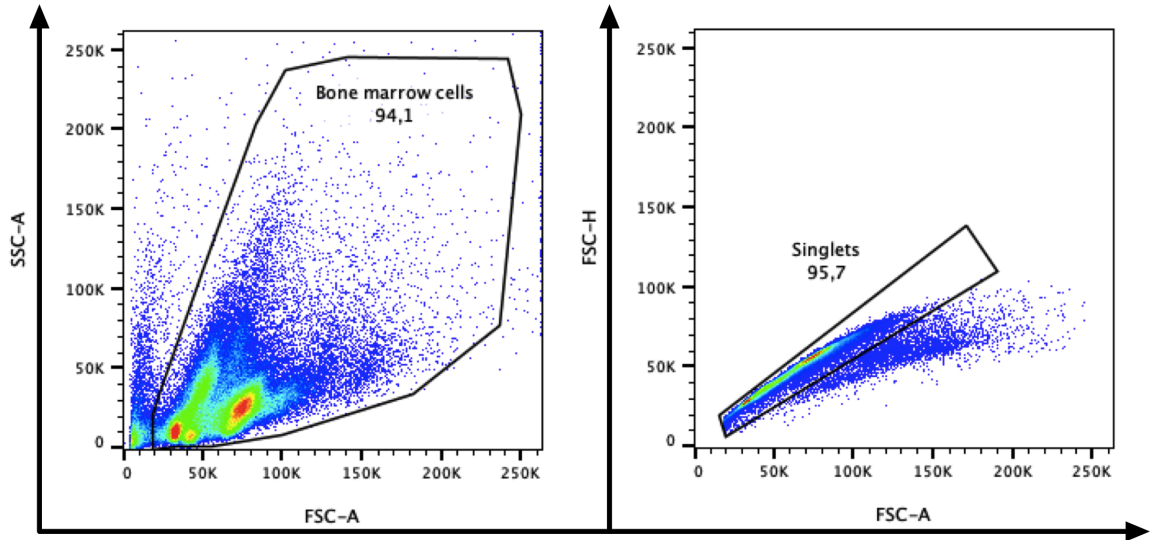
References

1. Alcoholism NI. Understanding alcohol use disorder. *Natl Inst Alcohol Abuse Alcohol* (2019), 4–6. https://www.niaaa.nih.gov/sites/default/files/publications/Alcohol_Use_Disorder.pdf.
2. Le Daré B, Lagente V, Gicquel T. Ethanol and its metabolites: update on toxicity, benefits, and focus on immunomodulatory effects. *Drug Metab Rev* (2019) 51:545–61. doi: 10.1080/03602532.2019.1679169
3. Shi X, DeLucia AL, Bao J, Zhang P. Alcohol abuse and disorder of granulopoiesis. *Physiol Behav* (2019) 63:1–18. doi: 10.1016/j.pharmthera.2019.03.001
4. Kellie S, Al-Mansour Z. Overview of the immune system. *Micro- Nanotechnol. Vaccine Dev* (2017) 357:63–81. doi: 10.1016/B978-0-323-39981-4.00004-X
5. Shi X, DeLucia AL, Bao J, Zhang P. Alcohol abuse and disorder of granulopoiesis. *Pharmacol Ther* (2019) 198:206–19. doi: 10.1016/j.pharmthera.2019.03.001
6. Sarkar D, Jung MK, Wang HJ. Alcohol and the immune system. *Alcohol Res Curr Rev* (2015) 37:153–5. doi: 10.1136/bmj.298.6673.543
7. Szabo G, Saha B. Alcohol's effect on host defense. *Alcohol Res Curr Rev* (2015) 37:159–70.
8. Wickramasinghe SN. Rates of metabolism of ethanol to acetate by human neutrophil precursors and macrophages. *Alcohol Alcohol* (1985) 20:299–303. doi: 10.1093/oxfordjournals.alcalca.a044537
9. Zakhari S. Overview: How is alcohol metabolized by the body? *Alcohol Res Heal* (2006) 29:245–54.
10. Cederbaum AI. Alcohol metabolism. *Clin Liver Dis* (2012) 16:667–85. doi: 10.1016/j.cld.2012.08.002
11. Bradford BU, Rusyn I. Swift increase in alcohol metabolism (SIAM): Understanding the phenomenon of hypermetabolism in liver. *Alcohol* (2005) 35:13–7. doi: 10.1016/j.alcohol.2004.12.001
12. Hawkins RD, Kalant H. No title. *Pharmacol Rev* (1972) 24:67–157.

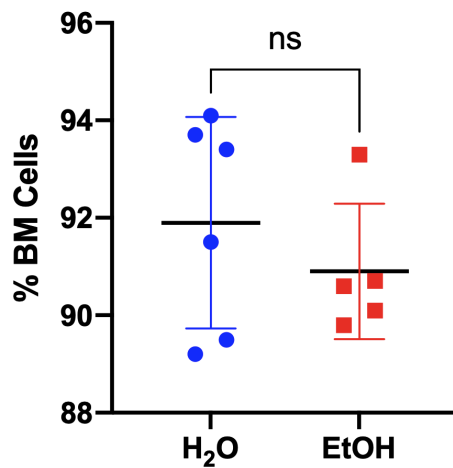
13. Zakhari S, Li TK. Determinants of alcohol use and abuse: impact of quantity and frequency patterns on liver disease. *Hepatology* (2007) 46:2032–9. doi: 10.1002/hep.22010
14. Lieber CS. Ethanol metabolism, cirrhosis and alcoholism. *Clin Chim Acta* (1997) 257:59–84. doi: 10.1016/S0009-8981(96)06434-0
15. Loftus RM, Finlay DK. Immunometabolism: Cellular metabolism turns immune regulator. *J Biol Chem* (2016) 291:1–10. doi: 10.1074/jbc.R115.693903
16. Al-Khami AA, Rodriguez PC, Ochoa AC. Energy metabolic pathways control the fate and function of myeloid immune cells. *J Leukoc Biol* (2017) 102:369–80. doi: 10.1189/jlb.1VMR1216-535R
17. Buck MD, Sowell RT, Kaech SM, Pearce EL. Metabolic instruction of immunity. *Cell* (2017) 169:570–86. doi: 10.1016/j.cell.2017.04.004
18. Wang A, Luan HH, Medzhitov R. An evolutionary perspective on immunometabolism. *Science* (2019) 80–):363. doi: 10.1126/science.aar3932
19. Artyomov MN, Van den Bossche J. Immunometabolism in the single-cell era. *Cell Metab* (2020) 32:710–25. doi: 10.1016/j.cmet.2020.09.013
20. Cichon I, Ortman W, Kolaczowska E. Metabolic pathways involved in formation of spontaneous and lipopolysaccharide-induced neutrophil extracellular traps (NETs) differ in obesity and systemic inflammation. *Int J Mol Sci* (2021) 22:1–29. doi: 10.3390/ijms22147718
21. Yeligar SM, Harris FL, Hart CM, Brown LAS. Ethanol induces oxidative stress in alveolar macrophages via upregulation of NADPH oxidases. *J Immunol* (2012) 188:3648–57. doi: 10.4049/jimmunol.1101278
22. Canuto GAB, Castilho-Martins EA, Tavares MFM, Rivas L, Barbas C, López-González Á. Multi-analytical platform metabolomic approach to study miltefosine mechanism of action and resistance in leishmania. *Anal Bioanal Chem* (2014) 406:3459–76. doi: 10.1007/s00216-014-7772-1
23. Andrisic L, Dudzik D, Barbas C, Milkovic L, Grune T, Zarkovic N. Short overview on metabolomics approach to study pathophysiology of oxidative stress in cancer. *Redox Biol* (2018) 14:47–58. doi: 10.1016/j.redox.2017.08.009
24. Yang Z, Kusumanchi P, Ross RA, Heathers L, Chandler K, Oshodi A, et al. Serum metabolomic profiling identifies key metabolic signatures associated with pathogenesis of alcoholic liver disease in humans. *Hepatol Commun* (2019) 3:542–57. doi: 10.1002/hep4.1322
25. Kim SJ, Jung YS, Kwon DY, Kim YC. Alleviation of acute ethanol-induced liver injury and impaired metabolomics of s-containing substances by betaine supplementation. *Biochem Biophys Res Commun* (2008) 368:893–8. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.02.003
26. Li S, Liu H, Jin Y, Lin S, Cai Z, Jiang Y. Metabolomics study of alcohol-induced liver injury and hepatocellular carcinoma xenografts in mice. *J Chromatogr. B Anal Technol BioMed Life Sci* (2011) 879:2369–75. doi: 10.1016/j.jchromb.2011.06.018
27. Manna SK, Patterson AD, Yang Q, Krausz KW, Li H, Idle JR, et al. Identification of noninvasive biomarkers for alcohol-induced liver disease using urinary metabolomics and the ppara-null mouse. *J Proteome Res* (2010) 9:4176–88. doi: 10.1021/pr100452b
28. Yeligar SM, Chen MM, Kovacs EJ, Sisson JH, Burnham EL, Ann L, et al. Alcohol and lung injury and immunity HHS public access. *Alcohol* (2016) 55:51–9. doi: 10.1016/j.alcohol.2016.08.005
29. Malacco NLS de O, Souza JAM, Martins FRB, Rachid MA, Simplicio JA, Tirapelli CR, et al. Chronic ethanol consumption compromises neutrophil function in acute pulmonary aspergillus fumigatus infection. *Elife* (2020) 9:1–23. doi: 10.7554/eLife.58855
30. Dunn WB, Ellis DI. Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. *TRAC - Trends Anal Chem* (2005) 24:285–94. doi: 10.1016/j.trac.2004.11.021
31. Kasicka-Jonderko A. Alcohol and the digestive system – should it always be blamed? *Prz Gastroenterol* (2012) 7:264–75. doi: 10.5114/pg.2012.32064
32. Mehta AJ, Guidot DM. Alcohol abuse, the alveolar macrophage and pneumonia. *Am J Med Sci* (2012) 343:244–7. doi: 10.1097/MAJ.0b013e31823ede77
33. Luong TT, Kim EH, Bak JP, Nguyen CT, Choi S, Briles DE, et al. Ethanol-induced alcohol dehydrogenase e (AdhE) potentiates pneumolysin in streptococcus pneumoniae. *Infect Immun* (2015) 83:108–19. doi: 10.1128/IAI.02434-14
34. Rao R, Topiwala A. Alcohol use disorders and the brain. *Addiction* (2020) 115:1580–9. doi: 10.1111/add.15023
35. Latvala J, Parkkila S, Niemelä O. Excess alcohol consumption is common in patients with cytopenia: Studies in blood and bone marrow cells. *Alcohol Clin Exp Res* (2004) 28:619–24. doi: 10.1097/01.ALC.0000122766.54544.3B
36. Di Rocco G, Baldari S, Pani G, Toietta G. Stem cells under the influence of alcohol: effects of ethanol consumption on stem/progenitor cells. *Cell Mol Life Sci* (2019) 76:231–44. doi: 10.1007/s00018-018-2931-8
37. Martinez SR, Maresa S, Gay and LZ. Nicotinamide riboside, an NAD⁺ precursor, attenuates the development of liver fibrosis in a diet-induced mouse model of liver. *Physiol Behav* (2016) 176:139–48. doi: 10.1016/j.bbdis.2019.06.009.Nicotinamide
38. Garaycochea JI, Crossan GP, Langevin F, Mulderrig L, Louzada S, Yang F, et al. Alcohol and endogenous aldehydes damage chromosomes and mutate stem cells. *Nature* (2018) 553:171–7. doi: 10.1038/nature25154
39. Van den Bossche J, O'Neill LA, Menon D. Macrophage immunometabolism: Where are we (Going)? *Trends Immunol* (2017) 38:395–406. doi: 10.1016/j.it.2017.03.001
40. Wang F, Zhang S, Vuckovic I, Jeon R, Lerman A, Folmes CD, et al. Glycolytic stimulation is not a requirement for M2 macrophage differentiation. *Cell Metab* (2018) 28:463–475.e4. doi: 10.1016/j.cmet.2018.08.012
41. Tannahill GM, Curtis AM, Adamik J, Palsson-McDermott EM, McGettrick AF, Goel G, et al. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 β through HIF-1 α . *Nature* (2013) 496:238–42. doi: 10.1038/nature11986
42. Viola A, Munari F, Sánchez-Rodríguez R, Scolaro T, Castegna A. The metabolic signature of macrophage responses. *Front Immunol* (2019) 10:1–16. doi: 10.3389/fimmu.2019.01462
43. Jiang M, Chen Z, Li H, Zhang T, Yang M, Peng X, et al. Succinate and inosine coordinate innate immune response to bacterial infection. *PLoS Pathog* (2022) 18:e1010796. doi: 10.1371/journal.ppat.1010796
44. Lee JW, Bae SH, Jeong JW, Kim SH, Kim KW. Hypoxia-inducible factor (HIF-1) α : Its protein stability and biological functions. *Exp Mol Med* (2004) 36:1–12. doi: 10.1038/emmm.2004.1
45. Palazon A, Goldrath AW, Nizet V, Johnson RS. HIF transcription factors, inflammation, and immunity. *Immunity* (2014) 41:518–28. doi: 10.1016/j.immuni.2014.09.008
46. Hakak Y, Lehmann-Bruinsma K, Phillips S, Le T, Liaw C, Connolly DT, et al. The role of the GPR91 ligand succinate in hematopoiesis. *J Leukoc Biol* (2009) 85:837–843. doi: 10.1189/jlb.1008618
47. Raucci A, Laplantine E, Mansukhani A, Basilio C. Activation of the ERK1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase pathways mediates fibroblast growth factor-induced growth arrest of chondrocytes. *J Biol Chem* (2004) 279:1747–56. doi: 10.1074/jbc.M310384200
48. Nadra I, Mason JC, Philippidis P, Florey O, Smythe CDW, McCarthy GM, et al. Proinflammatory activation of macrophages by basic calcium phosphate crystals via protein kinase c and MAP kinase pathways: A vicious cycle of inflammation and arterial calcification? *Circ Res* (2005) 96:1248–56. doi: 10.1161/01.RES.0000171451.88616.c2
49. Thakur V, McMullen MR, Pritchard MT, Nagy LE. Regulation of macrophage activation in alcoholic liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* (2007) 22:53–6. doi: 10.1111/j.1440-1746.2006.04650.x
50. Hazeldine J, Hampson P, Opoku FA, Foster M, Lord JM. N-formyl peptides drive mitochondrial damage associated molecular pattern induced neutrophil activation through ERK1/2 and P38 MAP kinase signalling pathways. *Injury* (2015) 46:975–84. doi: 10.1016/j.injury.2015.03.028
51. Voutilainen T, Kärkkäinen O. Changes in the human metabolome associated with alcohol use: A review. *Alcohol Alcohol* (2019) 54:225–34. doi: 10.1093/alcalc/aggz030
52. Ardito F, Giuliani M, Perrone D, Troiano G, Muzio L. The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy (Review). *Int J Mol Med* (2017) 40:271–80. doi: 10.3892/ijmm.2017.3036
53. National Center for Biotechnology Information. *PubChem pathway summary for pathway SMP0000006, tyrosine metabolism, source: PathBank* (2023). Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/pathway/PathBankSMP0000006>.
54. Kaphalia AL, Calhoun WJ. Alcoholic Lung Injury: Metabolic, Biochemical and Immunological Aspects. *Toxicol Lett* (2013) 24:1–21. doi: 10.1016/j.toxlet.2013.07.016
55. Ansel KM. RNA Regulation of the immune system. *Immunol Rev* (2013) 253:5–11. doi: 10.1111/imr.12062
56. Xie Y, Wei Y. A novel regulatory player in the innate immune System : Long non-coding RNAs. *Int J Mol Sci* (2021). doi: 10.3390/ijms22179535
57. Dudzik D, Barbas-Bernardos C, García A, Barbas C. Quality assurance procedures for mass spectrometry untargeted metabolomics. a review. *J Pharm BioMed Anal* (2018) 147:149–73. doi: 10.1016/j.jpba.2017.07.044

A

Supplementary Figure



B



Supplementary Figure. Gate strategy and percentage analysis of bone marrow cells. Bone marrow harvested from femur of 6 animals each EtOH and control (H₂O) group using 0.5% BSA in 1x phosphate buffered saline (PBS) were subjected to flow cytometry analysis on the FACSCanto II cytometer (Becton Dickinson). The relevant population was gated, using accepted criteria for cell complexity and size and excluding debris and singlets FSC and SSC plots were assessed using FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR, USA). Graph and statistical analysis were performed using Graph Pad Prism 8. Differences between different groups were analyzed by Test T Student. (A) The gate was drawn in order to eliminate cell debris and singlets (B) Test t analysis to using percentage cells into the gate among ethanol-treated and control group. *P* value: 0,3988

5.2. Capítulo 2. Análise metabolômica por LC-MS utilizando metanol como solvente de extração.

5.2.1. O consumo crônico de etanol altera o perfil metabolômico da medula impactando o metabolismo de ácidos graxos e o metabolismo do ácido araquidônico.

Após realizar o pré-processamento dos dados, obtivemos um total de 519 *molecular features* por meio da LC-MS, utilizando metanol como solvente de extração. Para avaliar a qualidade da análise instrumental, foram realizados os modelos PCA (Análise de Componentes Principais) e PLS-DA (Análise de Componentes Principais para a Discriminação Linear) utilizando as amostras de controle de qualidade (QC, do inglês *quality control*).

Na Figura 6A, pode-se observar o modelo PCA, onde as amostras de controle de qualidade estão agrupadas em uma área bem definida. Isso indica a robustez e estabilidade dos procedimentos analíticos utilizados. Além disso, na Figura 6B, foi

realizado o modelo supervisionado PLS-DA que também demonstra um agrupamento adequado das amostras de controle de qualidade.

Esses resultados confirmam a confiabilidade dos métodos analíticos empregados e a consistência dos resultados obtidos, proporcionando uma base sólida para a análise dos dados metabolômicos.

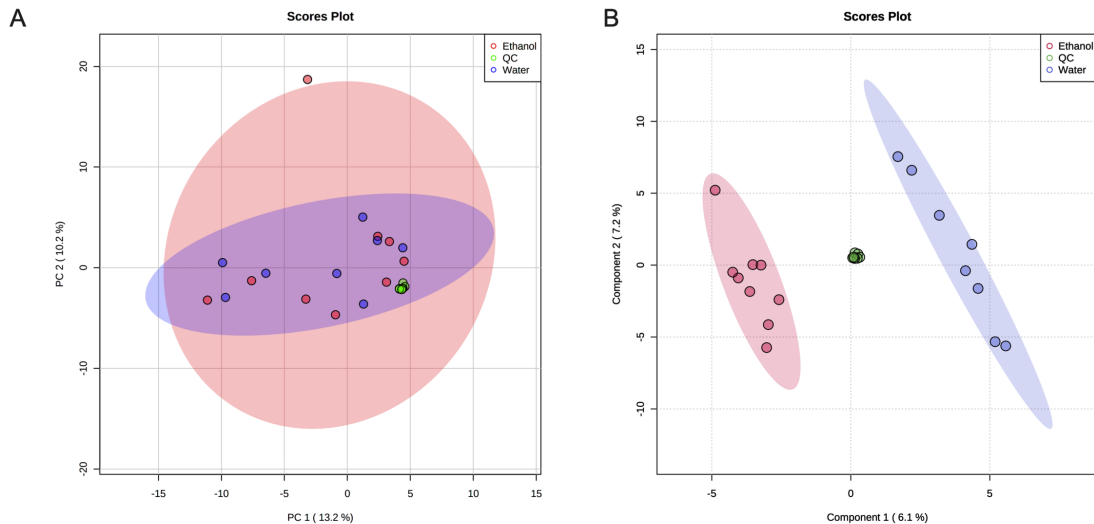


Figura 6 Modelos multivariados dos molecular features nas amostras celulares provenientes da medula óssea analisadas por LC-MS utilizando metanol como solvente de extração. (A) Modelo PCA e (B) Modelo PLS-DA. Ambos modelos foram construídos com conjunto de dados obtidos com controles de qualidade (QC) – círculo verde, grupo controle (H₂O) - círculo azul, grupo experimental (EtOH) – círculo vermelho (Accuracy= 0.31667 R²= 0.91185 e Q²= -0.29865)

Após a remoção dos QCs, a análise multivariada PLS-DA revelou uma separação clara entre os grupos, confirmando o efeito da administração crônica de álcool no metaboloma da medula óssea dos camundongos (Figura 7A). Um total de 99 *molecular features* contribuíram para explicar essa separação dos grupos, e dessas, 41 foram selecionadas para identificação. A seleção desses *molecular features* foi realizada considerando sua significância em análises univariadas e multivariadas.

Esses 41 possíveis metabólitos, que foram considerados os mais relevantes para distinguir os grupos, estão apresentados no gráfico de *Variable Importance Projection* (VIP>2) (Figura 7B) bem como na tabela 1 em anexo onde estão, também, apresentados os valores de VIP score para cada metabólito. A magnitude do efeito do tratamento na abundância desses metabólitos pode ser visualizada no *heatmap* (Figura 7C), onde é possível observar dois grandes agrupamentos de compostos,

contendo 24 *molecular features* com maior abundância no grupo tratado com etanol e 17 com menor abundância. Além disso, pequenos agrupamentos podem ser observados devido à variação no padrão de abundância dentro dos grupos (Figura 6C).

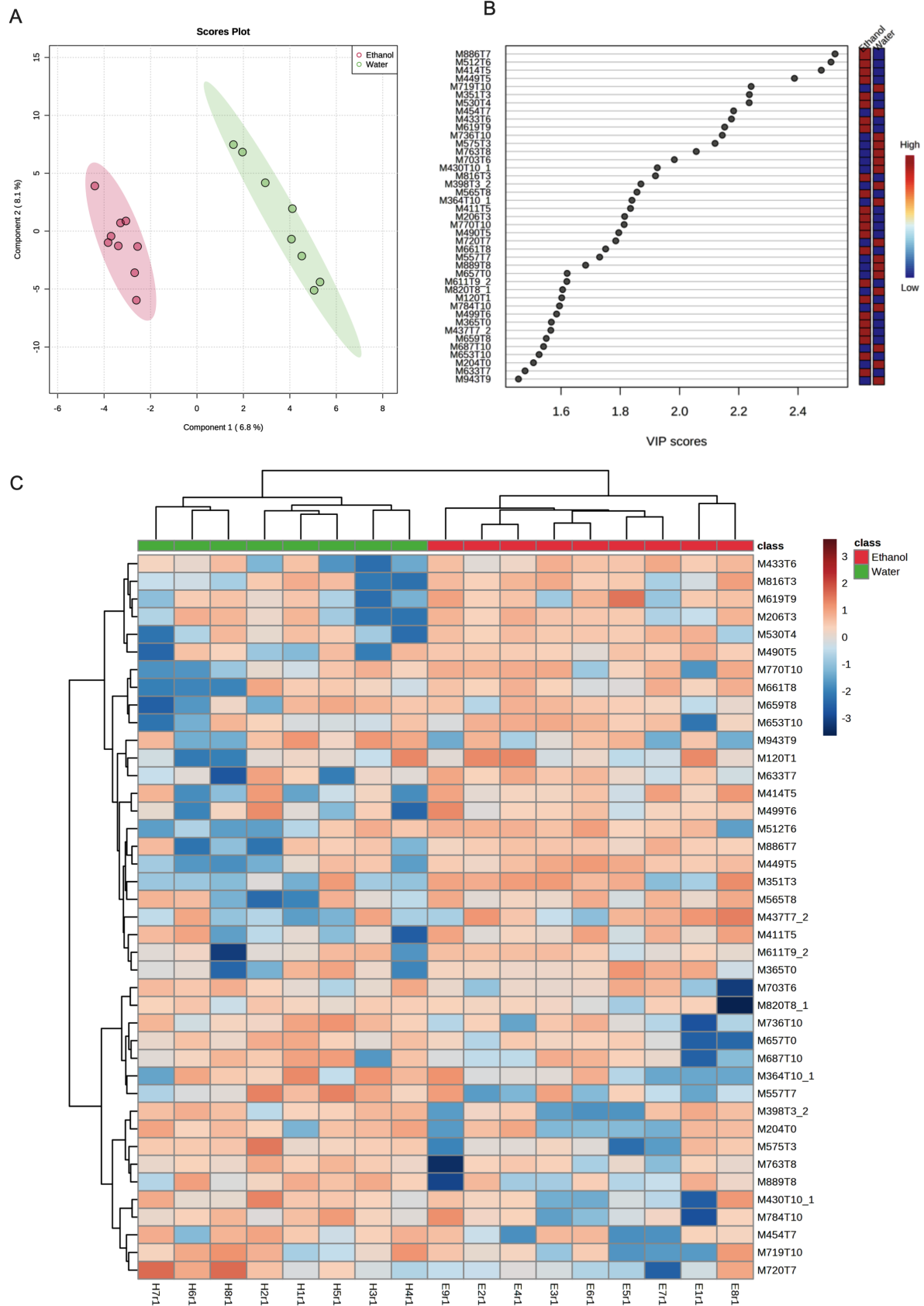


Figura 7. Análise estatística de separação dos grupos e o padrão de abundância de 41 molecular features obtidos por meio do LC-MS utilizando solução de metanol como solvente de extração.

A) Gráfico do PLS-DA construído para duas comparações (tratamento vs. controle) - círculo vermelho

e verde respectivamente (parâmetros do modelo $R^2 = 1,0$ e $Q^2 = 0,28579$). Os modelos foram gerados após o pré-processamento dos dados, transformação em \log_2 , normalização pela soma e escalonamento em pareto (B) *VIP score* contendo os metabólitos discriminantes entre os grupos estudados que foram selecionados para identificação. O *VIP score* >1 é considerado significativo. A escala de vermelho a azul indica abundância relativa de metabólitos no grupo tratado em comparação com o grupo controle. Vermelho representa maior abundância e azul menor. C) *Heatmap* construído com molecular features significativamente alterados na análise multivariada e multivariada. Os dendrogramas no topo e na vertical foram construídos com os seguintes parâmetros: distância – Euclidean e agrupamento Ward. A intensidade dos metabólitos é classificada por meio de uma escala de intensidade, que variam de -3 a 3, sendo os mais intensos com coloração avermelhada e os menos intensos com coloração mais azulada. Todas as análises foram realizadas na plataforma Metaboanalyst.

A identificação dos 41 *molecular features* permitiu classificá-los em 6 classes químicas distintas: ácidos graxos, glicerosfolipídios, aminoácidos e derivados, derivados de glutatona, carboidratos e vitaminas. Dentre essas *molecular features*, 24 metabólitos foram identificados e calculou-se o *Fold Change* (FC) para esses compostos. Esses dados bem como o valor de *VIP score* para cada composto estão apresentados na tabela 1.

Devido à variação no padrão de abundância dos compostos dentro dos grupos, conforme observado no *heatmap*, o FC foi calculado utilizando a mediana da intensidade do sinal do composto, seguido de normalização por \log_2 . Essa abordagem permite avaliar as alterações relativas na abundância dos metabólitos entre os grupos tratados com etanol e o controle, fornecendo informações sobre as mudanças significativas causadas pela administração crônica de álcool (Figura 8).

Tabela 1. Metabólitos identificados através da Cromatografia Líquida acoplada a espectrometria de massas utilizando e metanol como solvente de extração.

| Código | mz médio | Identificação putativa | Classe | FC (E/A) | VIP SCORE |
|----------|----------|---|--------------------|----------|-----------|
| M886T7 | 886,1481 | trans-2-Hexenoil-CoA | Ácidos Graxos | 0,76611 | 2,76 |
| M351T3 | 351,2498 | Ácido Araquidônico | Ácidos Graxos | 1,5294 | 2,49 |
| M575T3 | 575,4333 | Lipoamida | Ácidos Graxos | 0,612 | 2,04 |
| M206T3 | 206,0638 | 5-HETE | Ácidos Graxos | -1,069 | 2,2 |
| M331T3 | 331,2555 | Ácido -6-Eicosinóico | Ácidos Graxos | -0,95237 | 1,98 |
| M398T3_2 | 398,3067 | N-linoleoil | Ácidos Graxos | -0,69772 | 1,91 |
| M400T5 | 400,343 | Palmitoilcarnitina | Ácidos Graxos | -0,81297 | 1,1 |
| M449T5 | 449,2893 | lisophosphatidilinositol 22:6 | Glicerosfolipídios | 1,2145 | 2,63 |
| M433T6 | 433,21 | 1-(1Z-hexadecenil)-glicero-3-phosphato | Glicerosfolipídios | 1,0053 | 2,43 |
| M816T3 | 815,5817 | Fosfatidilglicerol | Glicerosfolipídios | 0,88955 | 2,16 |
| M490T5 | 490,2806 | 1-tetradecanoil-sn-glicero-3-phosphocholine | Glicerosfolipídios | 0,68878 | 2,03 |

| | | | | | |
|-----------|------------|--|-------------------------|----------|--------|
| M437T7_2 | 437,2705 | ácido lisofosfatídico | Glicerofosfolípidios | 0,96029 | 1,78 |
| M421T7 | 421,2526 | triacilglicerol | Glicerofosfolípidios | 0,43982 | 1,25 |
| M646T6 | 607,4213 | 1,2-didodecanoil-sn-glycero-3-phospho-N,N-dimethylethanolamine | Glicerofosfolípidios | 0,46189 | 1,4476 |
| M469T6_2 | 469,2439 | Éter metílico de formilmetionil-leucil-fenilalanina | Aminoácidos e derivados | 1,0059 | 2,67 |
| M411T5 | 411,0947 | Phe-Val-OH | Aminoácidos e derivados | 0,8219 | 2,07 |
| M120T1 | 120,0807 | Feniletanolamina | Aminoácidos e derivados | 0,8974 | 1,81 |
| M365T0 | 365,1058 | Asn Cys Glu | Aminoácidos e derivados | 0,63345 | 1,77 |
| M565T8 | 565,1988 | 5-S-glutationil-L | Glutaciona e derivados | 0,66538 | 2,07 |
| M430T10_1 | 430,0909 | Sulfametoxazol N1-glucuronídeo | Glutaciona e derivados | -0,78792 | 1,99 |
| M611T9_2 | 611,1871 | Glutaciona dissulfeto de amida | Glutaciona e derivados | 0,5351 | 1,82 |
| M512T6 | 512,13 | Ácido fólico | Carboidrato e vitaminas | 1,341 | 2,75 |
| M365T5 | 365,1364 | Glucose-1,3-mannose oligosaccharide | Carboidrato e vitaminas | 1,0769 | 1,44 |
| M414T5 | 414,0927 | Não identificado | Não identificado | 0,95572 | 2,75 |
| M530T4 | 529,8631 | Não identificado | Não identificado | 0,97301 | 2,47 |
| M619T9 | 619,138093 | Não identificado | Não identificado | 1,7126 | 2,4 |
| M719T10 | 719,2113 | Não identificado | Não identificado | -1,2851 | 2,35 |
| M454T7 | 454,4459 | Não identificado | Não identificado | -1,1105 | 2,29 |
| M119T0 | 119,0893 | Não identificado | Não identificado | 0,93756 | 2,28 |
| M763T8 | 763,2019 | Não identificado | Não identificado | -0,85191 | 2,14 |
| M703T6 | 703,2158 | Não identificado | Não identificado | -0,73122 | 2,06 |
| M770T10 | 770,1041 | Não identificado | Não identificado | 1,3567 | 2,02 |
| M661T8 | 661,1837 | Não identificado | Não identificado | 0,67728 | 1,99 |
| M651T10_1 | 651,1467 | Não identificado | Não identificado | -1,0396 | 1,99 |
| M364T10_1 | 363,5521 | Não identificado | Não identificado | -1,0961 | 1,9 |
| M720T7 | 720,2279 | Não identificado | Não identificado | -1,1998 | 1,81 |
| M499T6 | 499,129 | Não identificado | Não identificado | 0,55034 | 1,81 |
| M632T4_1 | 631,9755 | Não identificado | Não identificado | -0,85874 | 1,53 |
| M303T4_1 | 302,5661 | Não identificado | Não identificado | -0,66752 | 1,39 |
| M370T3_1 | 369,7198 | Não identificado | Não identificado | -0,57868 | 1,15 |

*FC: fold change, calculado a partir da razão entre mediana da abundância do grupo etanol e o grupo controle.

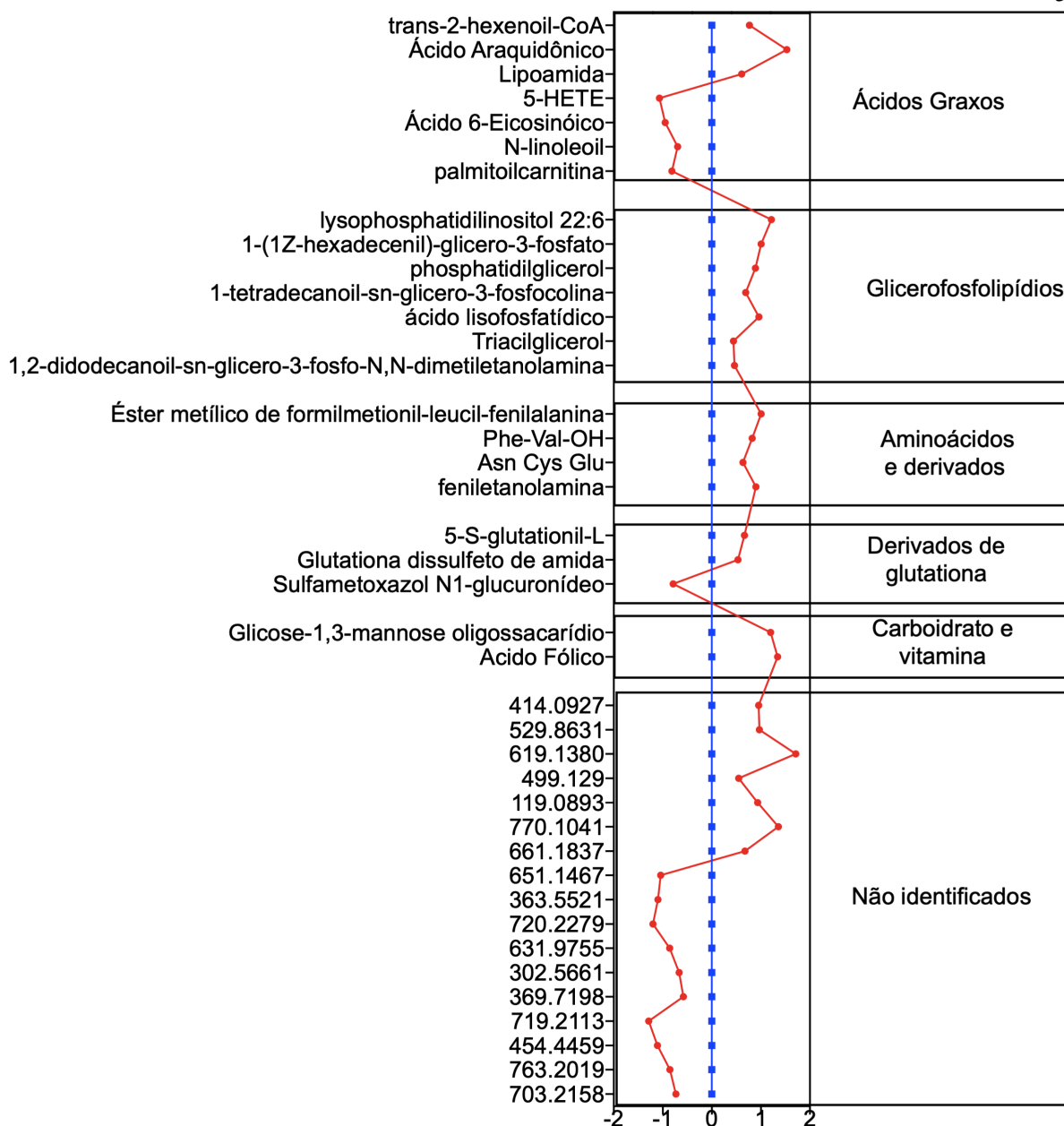


Figura 8. Metabólitos identificados pela análise de LC-MS utilizando metanol como solvente de extração e os respectivos *Fold Change* (FC). Os compostos foram categorizados de acordo com a classe química no banco de dados Pubchem e lipidmaps. Valores nos gráficos de -2 a 2 representam o \log_2 do FC calculado a partir da mediana da intensidade do sinal para cada composto de cada amostra do grupo Etanol (E) em razão a mediana da intensidade do sinal para cada composto de cada amostra do grupo controle (A). Vermelho representam o FC do grupo Etanol e azul do grupo controle. Compostos não identificados estão apresentados através do mz médio.

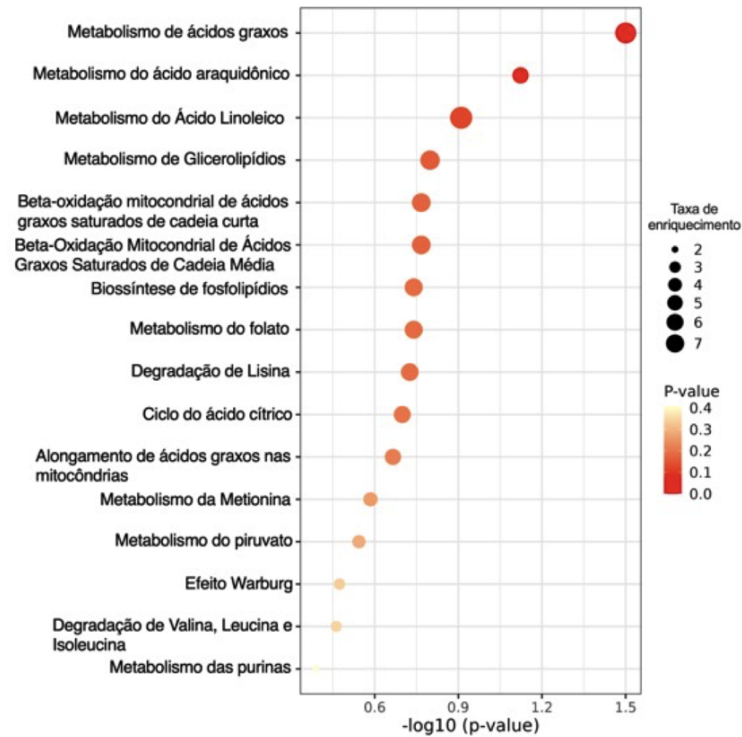
Com o objetivo de identificar os efeitos biológicos resultantes da administração crônica de etanol por meio da identificação dos metabólitos alterados, foi realizada a Análise de Enriquecimento do Conjunto de Metabólitos (MSEA, *Metabolite Set Enrichment Analysis*) utilizando a plataforma MetaboAnalyst. Essa análise avalia a presença de metabólitos na lista fornecida, denominados como *Hits* observados, em

relação ao número esperado de metabólitos envolvidos em uma determinada via (*Hits* esperados), com base em uma base de dados de referência. A base de dados selecionada foi a *Metabolic Pathway Associated Metabolite Sets* (SMPDB).

A análise de enriquecimento geral utiliza o teste hipergeométrico para avaliar se um conjunto específico de metabólitos está representado de forma significativa em relação ao acaso dentro da lista de compostos fornecida. Essa análise revelou o metabolismo de ácidos graxos como uma via enriquecida, indicando que sua perturbação não ocorre por acaso (Figura 9A).

Além disso, buscando compreender melhor os efeitos biológicos decorrentes do consumo crônico de etanol no metaboloma da medula óssea, foi conduzida uma análise de Impacto de Via. Essa análise, que utiliza o teste exato de Fisher e o teste hipergeométrico, leva em consideração a taxa de enriquecimento da via e a posição dos metabólitos enriquecedores dentro dela. A análise topológica foi realizada para avaliar o índice de impacto da via, utilizando o parâmetro da Centralidade de Intermediação Relativa. Como resultado, três vias foram identificadas como estatisticamente impactadas: Metabolismo do Ácido Araquidônico, Degradação de Ácidos Graxos e Metabolismo de Folato (Figura 9B). No entanto, apenas o metabolismo do ácido araquidônico mostrou-se relevante para a interpretação biológica devido ao baixo impacto observado nas demais vias.

A



B

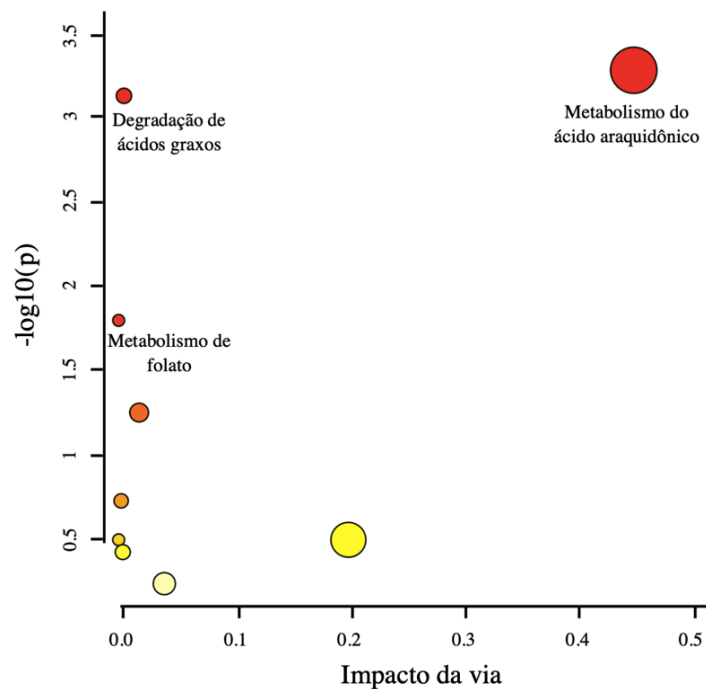


Figura 9. Análise de enriquecimento e impacto de vias. A) Gráfico de pontos da visão geral da análise de enriquecimento. A taxa do enriquecimento é calculada pela razão entre Hits / Expected, onde hits = hits observados; esperado = acertos esperados. As vias foram baseadas no banco de dados Small Molecule Pathway Database (SMPD) tendo como parâmetro vias metabólicas normais humanas. B) Vias impactadas pela administração crônica de etanol. Cores dos círculos variando de amarelo a vermelho representam a significância do teste onde vermelho representam vias estatisticamente significativas. O tamanho do círculo representa a intensidade do impacto sendo que tamanhos maiores

representam maior impacto. Eixo x refere-se a um score de impacto na via, eixo y valores de p. ($\log_{10}(p) > 1,3$ é significativo). Análises realizadas no programa MetaboAnalyst.

5.3. Capítulo 3. Análise metabolômica por LC-MS utilizando metanol clorofórmio e água

5.3.1. A administração crônica de etanol impacta o metabolismo de glicerofosfolípidios, esfingolípídios e do ácido araquidônico

Após o pré-processamento dos dados obtidos por LC-MS utilizando a mistura metanol: clorofórmio: água 1:3:1 (v/v/v), identificamos um total de 657 *molecular features*. Dentre eles, 217 contribuíram para explicar a separação dos grupos analisados. Desses, 54 apresentaram significância estatística tanto na análise univariada quanto na análise multivariada, o que os tornou alvos para identificação posterior.

A fim de avaliar a qualidade das corridas, realizamos a análise utilizando os modelos PCA (Figura 10A) e PLS-DA (Figura 10B). Verificamos que os controles de qualidade (QCs) apresentaram um agrupamento consistente em uma região bem definida, confirmando a robustez e estabilidade dos procedimentos analíticos realizados nesta segunda corrida.

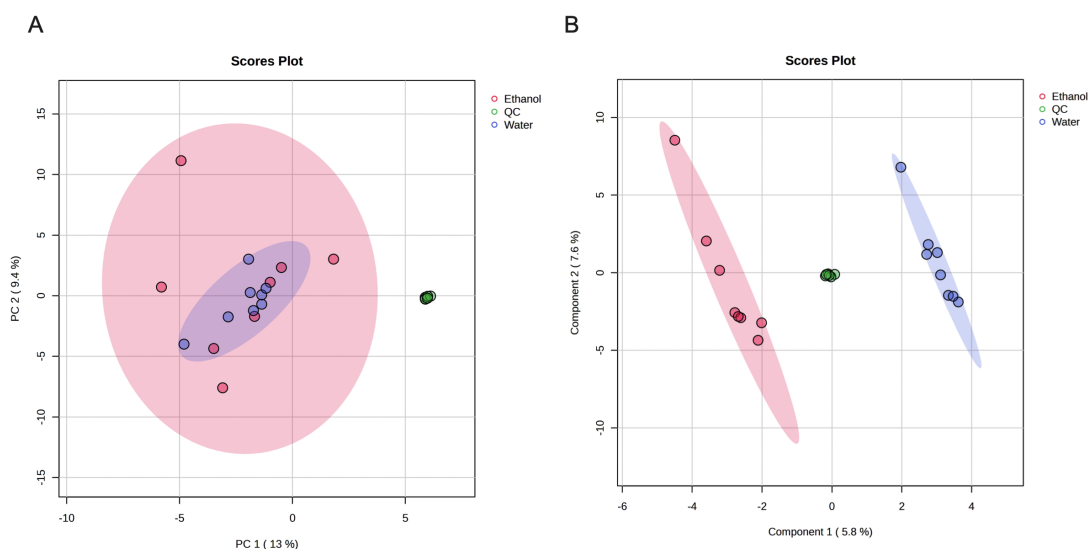


Figura 10. Modelos multivariados de metabólitos identificados nas amostras celulares analisadas por LC-MS utilizando solução de metanol: clorofórmio e água como solvente de extração. (A) Modelo PCA e (B) Modelo PLS-DA. Ambos modelos foram construídos com conjunto de dados obtidos com controles de qualidade (QC) – círculo verde, grupo controle (H₂O) - círculo azul, grupo experimental (EtOH) – círculo vermelho.

A análise multivariada PLS-DA, após a remoção dos controles de qualidade (QCs), confirmou uma separação clara entre os grupos, evidenciando o efeito da administração crônica de álcool no metaboloma da medula óssea de camundongos

(Figura 11A). Foram identificadas 54 molecular features discriminantes nos modelos de PLS-DA, as quais são apresentadas no gráfico de *Variable Importance Projection* (VIP>2) (Figura 11B).

Através do *heatmap* gerado a partir da matriz de dados, foi possível visualizar dois grandes agrupamentos distintos. O primeiro agrupamento representa um conjunto de metabólitos que apresentam menor abundância no grupo tratado com etanol em comparação com o grupo controle. O segundo agrupamento engloba os metabólitos que se apresentaram em maior abundância no grupo etanol. Além disso, variações no padrão de abundância dentro dos grupos etanol e controle podem ser observadas, o que explica a presença de agrupamentos menores no *heatmap* (Figura 11C).

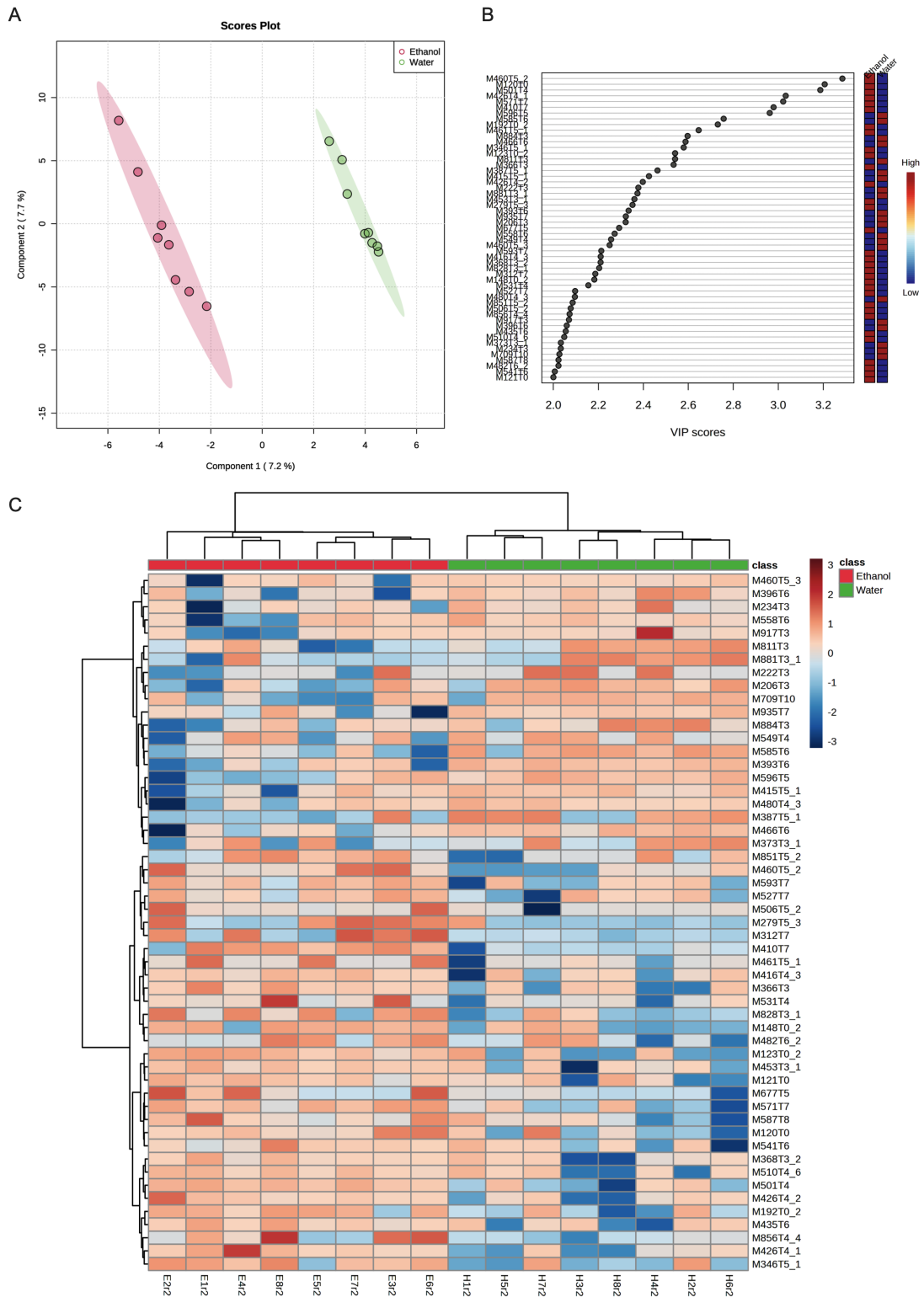


Figura 11. Análise estatística de separação dos grupos e o padrão de abundância dos *molecular features* obtidos por meio do LC-MS utilizando metanol como solvente A) Gráfico do PLS-DA construído para duas comparações (tratamento vs. controle) - círculo vermelho e verde respectivamente (Parâmetros do modelo $R^2 = 0,9906$ e $Q^2 = 0,31865$). Os modelos foram gerados após o pré-processamento dos dados, transformação em \log_2 , normalização pela soma e escalonamento em pareto (B) VIP score contendo *molecular features* discriminantes entre os grupos que foram selecionados para identificação. O escore VIP >1 é considerado significativo. A escala de vermelho a azul indica abundância relativa de metabólitos no grupo tratado em comparação com o grupo controle.

Vermelho representa maior abundância e azul menor. C) *Heatmap* construído com *molecular features* selecionados para identificação. Os dendrogramas no topo e na vertical foram construídos com os seguintes parâmetros: distância – Euclidean e agrupamento Ward. A intensidade dos metabólitos é classificada por meio de uma escala de intensidade, que variam de -3 a 3, sendo os mais intensos com coloração avermelhada e os menos intensos com coloração mais azulada. Todas as análises foram conduzidas na plataforma Metaboanalyst.

Por meio da análise dos *molecular features*, foram identificados putativamente 46 metabólitos os quais estão apresentados na tabela 2 juntamente com os referidos códigos utilizados nas análises antes da identificação, o *mz* médio, a identificação putativa, as classes, o *fold change* (FC) e os respectivos valores de *VIP score* obtidos pela análises PLS-DA. Os metabólitos não identificados estão apresentados por meio do valor médio de massa (*m/z*). A utilização da extração com metanol:clorofórmio:água permitiu a identificação de 8 classes químicas: ácidos graxos, eicosanoides, glicerofosfolipídios, glicerolipídios, esfingolipídios, lipídios esteróis, derivados da glicólise e outros compostos orgânicos com abundancia diferencial nas células dos animais tratados com etanol (figura 12).

Tabela 2. Metabólitos identificados através da Cromatografia Líquida acoplada a espectrometria de massas utilizando e metanol:clorofórmio:água como solvente de extração.

| Código | mz médio | Identificação putativa | Classe | FC (E/A) | VIP SCORE |
|----------|------------|---|---------------|----------|-----------|
| M120T0 | 120,065527 | Malonil CoA | Ácidos Graxos | 1,1385 | 3,28 |
| M192T0_2 | 192,158913 | Ácido 2-hidroxi pelargônico | Ácidos Graxos | 1,3112 | 2,8 |
| M206T3 | 206,063343 | Lipoamida | Ácidos Graxos | -1,1646 | 2,43 |
| M558T6 | 557,534043 | Oleato | Ácidos Graxos | -0,62053 | 2,29 |
| M362T3_2 | 362,241827 | Palmitato | Ácidos Graxos | 0,441 | 1,33 |
| M462T5_1 | 462,275507 | N-(2-fenoxi-etil)araquidonoilamina | Ácidos Graxos | -0,87026 | 1,94 |
| M453T3_3 | 453,343461 | N-estearoil triptofano | Ácidos Graxos | 0,82074 | 1,93 |
| M354T6_2 | 354,270262 | Ácido 5Z,8Z,11Z-Eicosatrienodióico | Ácidos Graxos | -0,68827 | 1,89 |
| M345T5 | 345,185164 | Ácido 6,9,12,15,18,21-Tetracosahexainóico | Ácidos Graxos | 1,1647 | 1,89 |
| M199T5 | 199,169098 | ácido 10Z-dodecenoico | Ácidos Graxos | 0,61191 | 1,82 |
| M1031T3 | 1031,35751 | 10Z-heptadecenoil-CoA | Ácidos Graxos | 0,37068 | 1,27 |
| M1028T3 | 1028,36393 | (E)-2,3-dideidropristanoil-CoA | Ácidos Graxos | 0,32068 | 1,26 |
| M545T4_2 | 545,240526 | Eicosatrienoato | Ácidos Graxos | -0,51096 | 2,02 |
| M427T5_1 | 427,221228 | ácido 7alfa-hidroxi-3-oxocol-4-en-24-oico | Ácidos Graxos | -0,63254 | 1,89 |
| M205T5_2 | 205,219421 | octacosanal | Ácidos Graxos | 0,34103 | 1,23 |
| M410T7 | 410,318992 | Prostagladina F2a | Ecoisanoides | 2,0368 | 3,06 |
| M366T3 | 366,221819 | Leucotrieno B4 | Ecoisanoides | 0,99472 | 2,62 |
| M368T3_2 | 368,220068 | Prostagladina H2 | Ecoisanoides | 0,65359 | 2,27 |
| M396T6 | 396,223853 | Lipoxina A4 | Ecoisanoides | -0,92028 | 2,06 |

| | | | | | |
|----------|------------|---|---------------------------|----------|------|
| M341T3_3 | 341,263152 | Leucotrieno D4 | Ecoisanoides | 0,7209 | 1,92 |
| M464T6 | 464,23976 | Prostaglandina E2 | Ecoisanoides | 0,54768 | 1,19 |
| M419T5_3 | 419,276385 | 1-(9Z-octadecenoil)-2-hexadecanoil-glicero-3-fosfo-(1'-mio-inositol) | Glicerofosfolípidios | -1,542 | 1,81 |
| M480T4_3 | 480,303899 | 1-(9Z-pentadecenoil)-glicero-3-fosfolina | Glicerofosfolípidios | -0,7506 | 2,12 |
| M510T4_6 | 510,3872 | 1,2-diacil-sn-glicero-3-fosfocolina | Glicerofosfolípidios | 0,64659 | 2,11 |
| M587T8 | 587,343945 | 1-(13Z,16Z-docosadienoil)-glicero-3-fosfo-(1'-sn-glicerol) | Glicerofosfolípidios | 1,0056 | 2,09 |
| M425T4_3 | 425,26312 | 1-heptadecanoil-glicero-3-fosfato | Glicerofosfolípidios | 0,54119 | 1,72 |
| M604T7_2 | 604,409255 | 1-Estearil-2-araquidonil-sn-glicero-3-fosfocolina | Glicerofosfolípidios | -0,71509 | 1,48 |
| M121T0 | 120,966463 | Ácido fosfatídico | Glicerofosfolípidios | 0,64686 | 2,06 |
| M478T3 | 478,214601 | 1-tridecanoil-sn-glicero-3-fosfoserina | Glicerofosfolípidios | 0,52574 | 1,37 |
| M571T7 | 571,429614 | 1-tridecanoil-2-(9Z,12Z,15Z-octadecatrienoil)-sn-glicerol | Glicerolípídios | 1,5399 | 3,09 |
| M555T8 | 555,466058 | 1,2,3-tridecanoil-sn-sn-glicerol | Glicerolípídios | 0,50278 | 1,68 |
| M784T9_2 | 783,574407 | N-(nonadecanoil)-esfing-4-enina-1-fosfocolina | Esfingolípídios | -1,4134 | 2,77 |
| M541T6 | 540,535827 | N-(hexadecanoil)-esfinganina | Esfingolípídios | 0,68624 | 2,06 |
| M380T9_2 | 380,252635 | Esfingosina-1-fosfato | Esfingolípídios | 0,91888 | 1,94 |
| M653T6 | 652,516117 | N-(octadecanoil)-1-β-glucosil-4E,6E-tetradecasfingadienina | Esfingolípídios | 0,27259 | 1,14 |
| M454T4_4 | 454,346899 | Ácido dihomô-ômega-muricílico | Lípídios esteróis | 0,62958 | 2,04 |
| M706T9 | 705,5832 | Colesterol 11-hidroperoxi-eicosatetraenoato | Lípídios esteróis | -0,81787 | 1,93 |
| M451T6_1 | 451,156521 | Sulfato de 17-hidroxipregnenolona | Lípídios esteróis | 0,40643 | 1,34 |
| M596T5 | 596,006651 | Ácido 3-fosfoglicérico | Carboidratos e conjugados | -1,229 | 3,02 |
| M426T4_2 | 426,1397 | 6-({3-[(1E)-but-1-en-1-il]-5-hidroxi-1-oxo-1H-isocromen-7-il}oxi)-3,4,5-trihidroxioxano-2 -ácido carboxílico | Carboidratos e conjugados | 1,11 | 2,45 |
| M506T5_2 | 506,160333 | Ácido 2-amino-4-({1-[(carboximetil)-C-hidroxicarbonimidoil]-2-[[1-hidroxi-1-(1-oxo-1H-isocromen-3-il)butan-2-il]sulfanil]etil}-C-hidroxicarbonimidoil)butanoico | Carboidratos e conjugados | 1,7038 | 2,13 |
| M379T5 | 379,084451 | Ácido 6-{{2,4-di-hidroxi-2,5-bis(hidroxiacetil)oxolan-3-il}oxi)-3,4,5-tri-hidroxi-oxano-2-carboxílico | Carboidratos e conjugados | 0,41051 | 1,55 |
| M324T5_1 | 324,217017 | 5'-Carboxi-gama-cromanol | Antioxidante | -0,686 | 1,94 |
| M417T3_1 | 416,84022 | Lactato | Derivados da glicólise | 0,31288 | 1,2 |
| M123T0_2 | 123,158735 | Não identificado | Não identificado | 1,0223 | 2,6 |
| M453T3_1 | 452,740994 | Não identificado | Não identificado | 0,83459 | 2,42 |
| M373T3_1 | 372,717741 | Não identificado | Não identificado | -0,92999 | 2,06 |
| M487T3_1 | 486,700083 | Não identificado | Não identificado | -1,2327 | 1,96 |
| M342T3 | 341,76442 | Não identificado | Não identificado | 0,70909 | 1,89 |
| M125T0 | 124,937455 | Não identificado | Não identificado | 1,3093 | 1,8 |
| M705T9_2 | 704,823109 | Não identificado | Não identificado | -0,72572 | 1,79 |
| M510T4_3 | 509,953282 | Não identificado | Não identificado | 0,60927 | 1,54 |

*FC: *fold change*. Calculado a partir da razão entre mediana da abundância do grupo etanol (E) e o grupo controle (A).

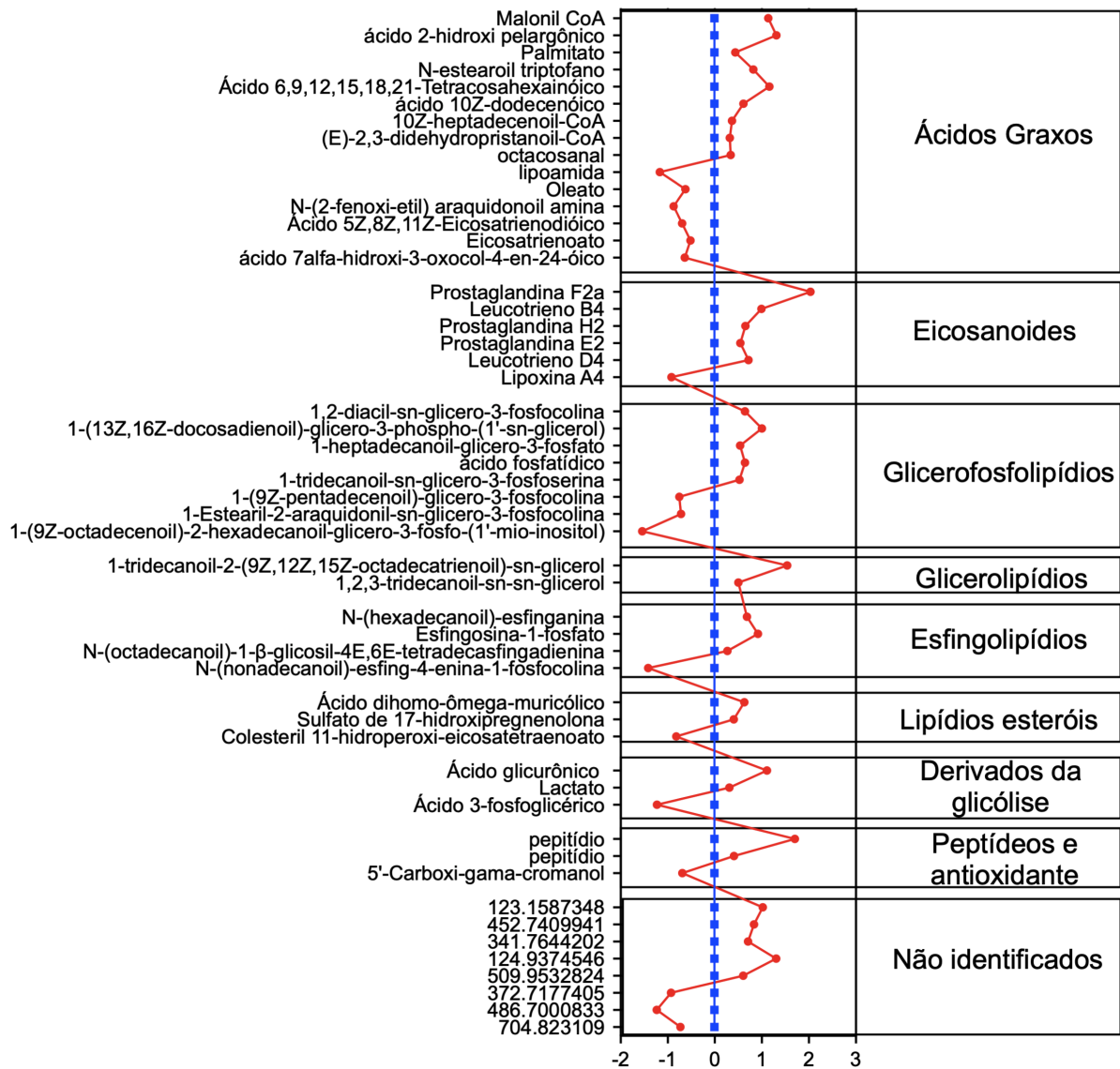
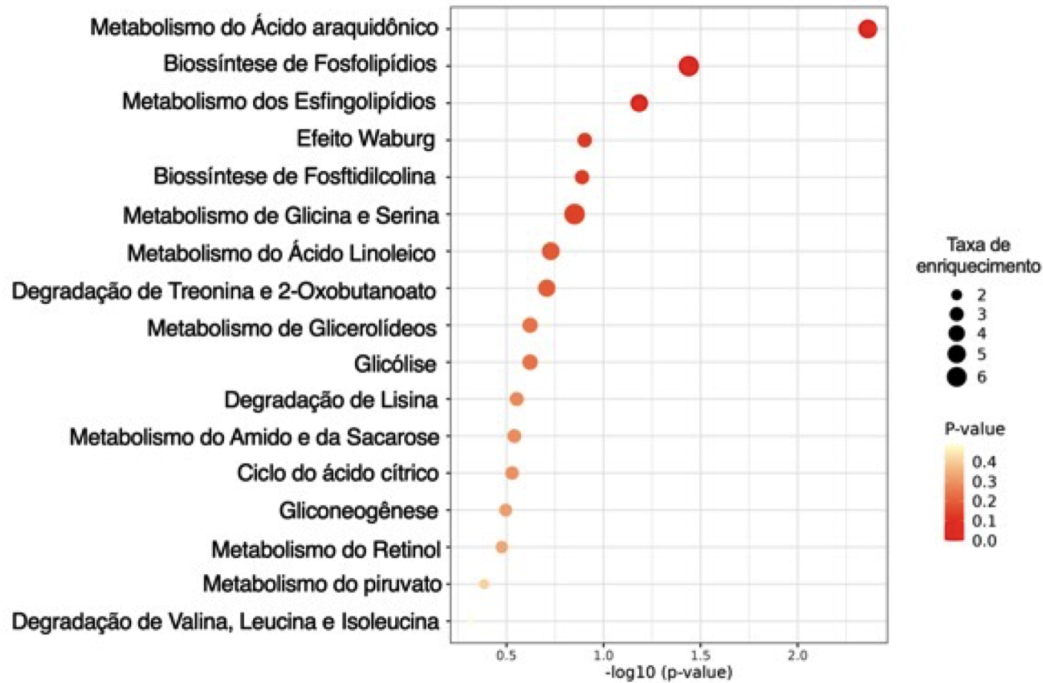


Figura 12. Metabolitos identificados pela análise de LC-MS utilizando metanol: clorofórmio: água como solvente de extração e os respectivos Fold Change (FC). Os compostos foram categorizados de acordo com a classe química no banco de dados Pubchem e lipidmap. Valores nos gráficos de -2 a 2 representam o log₂ do FC calculado a partir da mediana da intensidade do sinal para cada composto de cada amostra do grupo Etanol (E) em razão a mediana da intensidade do sinal para cada composto de cada amostra do grupo controle (A). Vermelho representam o FC do grupo Etanol e azul do grupo controle. Compostos não identificados estão apresentados através do m/z médio.

A Análise de Enriquecimento do Conjunto de Metabólitos (MSEA) foi novamente realizada para identificar padrões biológicos. Nessa análise, observou-se um enriquecimento significativo no metabolismo do ácido araquidônico (AA) e na biossíntese de fosfolipídios (Figura 13A), indicando que essas vias estão diretamente afetadas pela administração crônica de álcool. Além disso, a análise de Impacto de Via, utilizando os testes exato de Fisher e Hipergeométrico, revelou quatro vias que apresentaram impacto significativo: Metabolismo do Ácido Araquidônico, Metabolismo

de Glicerofosfolipídios, Metabolismo de Esfingolipídios e Metabolismo de Éster lipídio (Figura 13B).

A



B

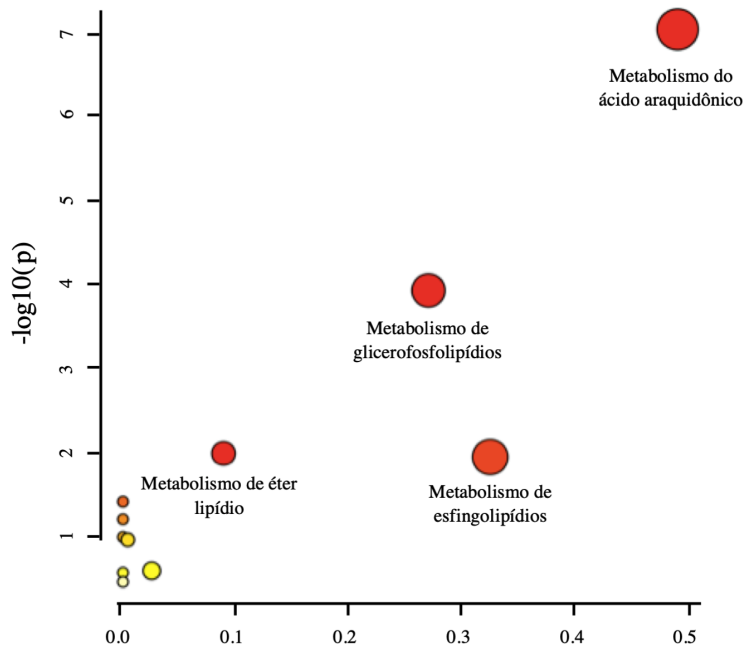


Figura 13. Vias metabólicas enriquecidas e impactadas pela administração crônica de etanol. A) Análise de enriquecimento de via. Taxa de enriquecimento (Enrichment Ratio) é computada pela razão hits observados/ hits esperados. Hits observados são os metabólitos que fazem parte dessa via com base nos bancos dados SMPD. Hits esperados são o número de metabólitos que fazem parte da via. Círculos em preto representam a taxa de enriquecimento que pode variar de 2 a 6 onde 2 representa a menor taxa e 6 a maior. A escala de intensidade para o valor de p com cores variando de amarelo para

vermelho onde vermelho representa valores próximo a significância estatística ($P < 0.05$) ($-\log_{10}(\text{p-value}) = 1,3$) foi considerado como significativo. B) Análise de impacto de via. Método de enriquecimento: teste exato de Fisher. Análise topológica: Relative betweenness centrality. Análise realizada na plataforma MetaboAnalyst. Cor vermelha indica p valor e tamanho do círculo indica metabólitos diferenciais (<https://www.metaboanalyst.ca>) $-\text{Log}_{10}(0.05)=1.3$.

6. DISCUSSÃO

O consumo crônico de álcool tem sido associado a efeitos prejudiciais em vários órgãos, células e tecidos do sistema imunológico, incluindo a medula óssea (BARR et al., 2016; SHI et al., 2019). Neste estudo, buscamos investigar o impacto do metabolismo do etanol na medula óssea em um nível metabólico, utilizando um modelo *in vivo* de consumo crônico de álcool. Por meio de três abordagens cromatográficas, foram obtidos resultados que indicam uma alteração na abundância de metabólitos, sugerindo um impacto no metabolismo de ácidos graxos (AG), glicerofosfolípidios (GF), esfingolipídios e do ácido araquidônico (AA).

Neste estudo, observamos um aumento na abundância do metabólito malonil CoA nas células da medula óssea dos animais tratados com etanol. O malonil CoA desempenha um papel central na regulação da síntese e degradação de ácidos graxos. Ele se acopla ao complexo da ácido graxo sintase, iniciando a síntese de ácidos graxos, e também inibe a ação da enzima carnitina O-palmitoiltransferase 1, impedindo a formação de palmitoilcarnitina, uma acilcarnitina que transporta ácidos graxos do citoplasma para a mitocôndria, onde ocorre a beta oxidação (SEAGER; SLABAUGH, 2015).

Além do malonil CoA, identificamos outros metabólitos relacionados à via de biossíntese de ácidos graxos, como o palmitato, oleato e eicosatrienoato. Também observamos um aumento na abundância do ácido graxo trans-2-hexanoil CoA e uma diminuição na abundância da palmitoilcarnitina. Esses metabólitos sugerem que o consumo crônico de etanol afeta a síntese e/ou inibição da degradação de ácidos graxos nas células da medula óssea (figura 8 e 12).

Uma das principais consequências do consumo crônico de etanol é o acúmulo de lipídios no fígado, conhecido como esteatose hepática. Isso ocorre porque o etanol interfere na oxidação dos ácidos graxos, levando a um desequilíbrio entre a síntese e a degradação desses compostos. O etanol aumenta a produção de NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido) em relação ao NAD⁺ (nicotinamida adenina dinucleotídeo), resultando em um aumento na relação NADH/NAD⁺. Essa mudança metabólica inibe a oxidação dos ácidos graxos pela beta oxidação, favorecendo a síntese e o acúmulo de lipídios no fígado (YOU; ARTEEL, 2019a).

O efeito do metabolismo do álcool no metabolismo de ácidos graxos na medula óssea ainda é pouco compreendido. No entanto, estudos indicam que o consumo crônico de etanol pode levar ao aumento do conteúdo lipídico na medula óssea devido ao comprometimento das células-tronco mesenquimais. Essa condição resulta de uma maior diferenciação dessas células em células adipogênicas levando ao acúmulo de lipídios na medula (CELLS, 2016; KAHLER-QUESADA et al., 2020; SOUSA et al., 2018).

Os resultados descritos acima e obtidos pela abordagem utilizando LC-MS somados a abundância diminuída de nicotinamida encontrada na abordagem utilizando o GC-MS sugerem que o metabolismo do etanol tem impactos negativos no metabolismo de ácidos graxos na medula óssea, inibindo a degradação e intensificando a síntese.

Fillmore e colaboradores (2015) analisaram o efeito de ácidos graxos no metabolismo energético e sobrevivência de células-tronco mesenquimais da medula óssea humana, *in vitro*. Eles observaram que o ácido palmítico induz apoptose, reduz a proliferação das células-tronco e diminui as taxas de beta-oxidação enquanto o ácido graxo oleato previne esses efeitos. Esses resultados indicam que a diminuição da oxidação de ácidos graxos saturados pode afetar negativamente a proliferação das células-tronco e levar à morte celular (FILLMORE et al., 2015).

Nossos resultados mostram que o consumo crônico de etanol aumentou a abundância de palmitato e diminuiu oleato, além disso, diminuiu a abundância de outros ácidos graxos (figura 8), sugerindo que o impacto do consumo crônico de etanol no metabolismo de ácidos graxos na medula óssea pode induzir a apoptose e afetar a proliferação de células troncos e assim impactar a hematopoiese.

O efeito do consumo crônico de etanol na hematopoiese tem sido investigado e o mecanismo é fortemente associado a deficiências na absorção de nutrientes essenciais, como ácido fólico, vitamina B12 e ferro, que são importantes para a produção adequada dos elementos figurados do sangue (CELLS, 2016, KAHLER-QUESADA et al., 2020). Sugerimos que as células da medula óssea podem estar apresentando uma adaptação ao metabolismo do etanol, utilizando-o como uma fonte de energia alternativa. Esse processo pode ter implicações no equilíbrio entre a síntese e a degradação de ácidos graxos na medula óssea e, potencialmente, afetar tanto a hematopoiese quanto na função efetora destas células.

Durante a beta oxidação, o malonil CoA atua como um regulador chave do metabolismo de ácidos graxos. Sua concentração aumenta quando não há necessidade imediata de energia (ATP) (FOSTER, 2012). Em relação ao metabolismo do etanol, postulamos que o aumento de malonil CoA na medula óssea pode estar relacionado ao fato de que o etanol é preferencialmente utilizado como substrato energético (ZAKHARI, 2006).

Nossa hipótese é que o metabolismo do etanol pode estar aumentando o suprimento de energia nas células da medula óssea, levando ao acúmulo de intermediários do ciclo de Krebs, como o citrato. O citrato é transportado das mitocôndrias para o citoplasma e convertido em malonil CoA. Essa conversão leva a uma maior disponibilidade de malonil CoA que por sua vez, inibe a degradação de ácidos graxo e ativa a síntese.

A síntese de ácidos graxos pode levar à formação de dois tipos principais de lipídios: os glicerolipídios (triglicerídeos), que desempenham a função de armazenamento de energia, e os glicerofosfolipídios (GL), que são os principais componentes dos fosfolipídios das membranas celulares (SEAGER; SLABAUGH, 2015). Os resultados obtidos nesse estudo sugerem que o consumo crônico de etanol afeta o metabolismo de ácidos graxos, especialmente a síntese de glicerofosfolipídios.

A síntese de glicerofosfolipídios ocorre em duas etapas principais. Inicialmente, o ácido fosfatídico é sintetizado pela esterificação do glicerol com um ácido graxo através de uma enzima chamada glicerol-3-fosfato aciltransferase. O ácido fosfatídico também pode ser produzido a partir de outros intermediários lipídicos, como diacilglicerol (DAG), por meio da ação de enzimas específicas (WENK, 2010).

Uma vez formado o ácido fosfatídico, ele serve como precursor para a síntese de diversos glicerofosfolipídios. O grupo fosfato do ácido fosfatídico pode ser modificado pela adição de diferentes moléculas, como colina, etanolamina ou serina, resultando na formação de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina, respectivamente (WENK, 2010).

A identificação do ácido fosfatídico (figura 12) como um componente presente em níveis aumentados, juntamente com a abundância aumentada de vários fosfolipídios na medula óssea de animais tratados com etanol (figura 8 e 12), sugerem que o metabolismo de etanol está afetando positivamente a síntese de fosfolipídios de membrana (figura 13A).

A biossíntese de glicerofosfolipídios está estreitamente relacionada à formação da membrana celular (CASARES; ESCRIBÁ; ROSSELLÓ, 2019). Como a medula óssea é um tecido altamente proliferativo, a síntese de membranas está constantemente ativada nesse tecido (ZHANG et al., 2003), e o metabolismo do álcool pode estar estimulando essa via. O acetaldeído, um intermediário do metabolismo do etanol, tem um impacto significativo na estrutura das membranas celulares, especialmente nas mitocôndrias (LE DARÉ; LAGENTE; GICQUEL, 2019a). O acetaldeído pode estar causando danos às membranas mitocondriais das células da medula óssea, o que, por sua vez, intensifica a síntese de fosfolipídios nesse tecido.

Uma indicação de estresse oxidativo resultante do metabolismo do etanol pelas células da medula óssea é a observação de um aumento na abundância de antioxidantes, como a glutathiona e seus derivados (Figura 8 e 12). No entanto, é importante ressaltar que não realizamos uma avaliação direta do estresse oxidativo, portanto, não podemos afirmar a presença desse fenômeno.

Os fosfolipídios, além de essenciais para a estrutura e função das membranas celulares, desempenham papéis importantes na formação de microdomínios lipídicos, como as chamadas "balsas lipídicas" ou "*lipid rafts*". Esses microdomínios são regiões especializadas das membranas que possuem uma composição lipídica e proteica distinta que atuam na organização e no funcionamento de proteínas de membrana, incluindo receptores de sinalização e proteínas envolvidas na endocitose e exocitose (SIMONS; IKONEN, 1997).

Além disso, alguns glicerofosfolipídios, como o fosfatidilinositol, desempenham um papel crucial na sinalização celular. Eles podem ser fosforilados gerando moléculas sinalizadoras importantes, como o fosfatidilinositol 3-fosfato (PI3P) e o fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2). Esses sinalizadores lipídicos estão envolvidos na regulação de processos celulares, como proliferação, diferenciação celular e apoptose (DI PAOLO; DE CAMILLI, 2006), bem como ativação e regulação de células do sistema imunológico presentes na medula óssea, como células T e células B (HAWKINS; STEPHENS, 2015).

Portanto, o efeito do consumo crônico de etanol no metabolismo de glicerofosfolipídios pode ter implicações na hematopoiese, afetando a capacidade proliferativa e de diferenciação de células precursoras mieloides e linfoides. Esses resultados sugerem um mecanismo adicional pelo qual o consumo crônico de etanol

pode afetar a granulopoiese, além do que vem sendo proposto na literatura. Os efeitos do metabolismo do álcool na granulopoiese são frequentemente associados ao efeito do etanol no sistema gastrointestinal, levando a uma menor absorção de nutrientes essenciais, como folato e vitaminas do complexo B. Além disso, os produtos do metabolismo do álcool, como o estresse oxidativo e a formação de adutos de acetaldéido, exercem efeitos citotóxicos, danificando membranas celulares e levando à apoptose (SHI, XIN; DELUCIA, ANGELO L; BAO, JIANXIN; ZHANG, 2019).

Outra classe de fosfolipídios identificadas neste estudo que sofreu impacto pela exposição crônica ao etanol são os esfingolipídios (figura 13B). Neste estudo identificamos 4 esfingolipídios com abundância aumentada no grupo etanol: 3 ceramidas e a esfingosina-1-fosfato.

O metabolismo de esfingolipídios é uma rede complexa de vias interconectadas (GAULT; OBEID; HANNUN, 2010). A identificação obtida neste trabalho indica um possível efeito do etanol no metabolismo dos esfingolipídios, especificamente na via de degradação e reciclagem. Nesse sentido, as ceramidas degradadas podem gerar esfingosina-1-fosfato, que, por sua vez, podem ser recicladas, resultando novamente na formação de ceramidas.

As ceramidas (CER) e a esfingosina-1-fosfato (S1F) são lipídios bioativos importantes envolvidos na modulação da resposta inflamatória (LEWIS et al., 2022; YOUNG et al., 2012) de tal forma que o acúmulo de ceramidas tem sido associado ao aumento da inflamação.

Becker e colaboradores (2009) investigaram o efeito da inalação de inibidores da esfingomielinase ácida (Asm) nos pulmões de camundongos com fibrose cística (CF). A esfingomielinase ácida é uma enzima importante no metabolismo dos esfingolipídios, responsável pela síntese de ceramida através da quebra da esfingomielina. Os resultados demonstraram que a inalação desses inibidores reduziu o acúmulo de ceramida nos pulmões dos camundongos com CF e restabeleceu os níveis normais de ceramida, resultando na redução da inflamação pulmonar (BECKER et al., 2010).

Por outro lado, a esfingosina-1-fosfato (S1P) tem sido associada a uma diminuição da inflamação. Isso porque, a S1P regula funções celulares que resultam no tráfego de linfócitos e na manutenção da integridade vascular, contribuindo assim para a regulação de processos inflamatórios (OBINATA; HLA, 2019).

Matloubian e colaboradores (2004) investigaram o papel do receptor de esfingosina-1-fosfato (S1P) na saída de linfócitos T e B dos órgãos linfoides. Seus resultados demonstraram que a ausência do receptor S1P nas células hematopoiéticas de camundongos impediu a saída dos linfócitos T do timo e resultou em uma deficiência grave das células B no sangue (MATLOUBIAN et al., 2004).

Um fenótipo semelhante foi observado por Allende e colaboradores (2010) quando investigaram o papel do receptor S1P na saída de células B imaturas da medula óssea para a corrente sanguínea. Eles constataram que a deleção do gene do receptor S1P resultou em uma diminuição do número de células B imaturas no sangue. Além disso, as células B imaturas em contato com o ambiente vascular da medula óssea apresentaram uma maior taxa de apoptose (ALLENDE et al., 2010).

O consumo de etanol, ao afetar o metabolismo dos esfingolípídios, pode estar desencadeando um processo inflamatório na medula óssea devido ao aumento da abundância de ceramidas como também pode comprometer a mobilidade das células hematopoiéticas resultando em comprometimento da programação funcional do sistema imunológico.

O metabolismo do etanol levou à síntese de eicosanoides na medula óssea (figura 12). Os eicosanoides são uma família de moléculas de sinalização biológica resultantes do metabolismo do ácido araquidônico que desencadeiam papéis importantes na programação da resposta inflamatória e um papel crucial na modulação da hematopoiese (CALDER, 2020). Em resposta a estímulos físicos ou químicos, como o próprio etanol (SIM et al., 2001), a enzima fosfolipase A2 age nos fosfolípídios de membrana, liberando o ácido araquidônico, que pode ser metabolizado através das vias da ciclooxigenase (COX) e da lipoxigenase (LOX).

A COX tem duas isoformas: a COX-1, expressa em condições fisiológicas, e a COX-2, expressa principalmente em células envolvidas no processo inflamatório. A ação dessas enzimas leva à formação de prostaglandinas e tromboxanos. O ácido araquidônico também pode ser metabolizado pela via da LOX, resultando na formação de leucotrienos e lipoxinas (CALDER, 2020; SANTERRE et al., 2015; STUBBS et al., 1988).

Identificamos a presença aumentada de seis eicosanoides (figura 12) e do ácido araquidônico (figura 8) no grupo tratado com etanol. Em pacientes alcoolistas, foi encontrada alta expressão de COX-2 e síntese de prostaglandina E2 no cérebro e

no líquido cefalorraquidiano, respectivamente (HO et al., 1999; MONTINE et al., 1999), assim como no fígado (HANKIN; CLAY; MURPHY, 1998). Não foram encontrados estudos que demonstrassem o efeito do consumo de etanol na síntese de eicosanoides na medula óssea, embora a importância desses mediadores na hematopoiese tenha sido demonstrada.

Leucotrienos e lipoxinas estimulam a proliferação de células progenitoras de granulócitos (CFU-GM) e inibem as unidades formadoras eritroides BFU-E e CFU-E, enquanto a prostaglandina E1 (PGE1) apresenta um efeito oposto, inibindo a proliferação de CFU-M e estimulando BFU-E e CFU-E *in vitro* (DUPUIS et al., 1997). Embora em nosso estudo não tenhamos observado o efeito da administração crônica de etanol na hematopoiese ao avaliar o perfil global das células da medula óssea (figura 1 do capítulo 1), observamos uma menor abundância de células de tamanhos menores e maior complexidade (figura 15 anexo), sugerindo que a administração crônica de etanol pode afetar a proliferação de precursores na medula óssea por meio da síntese de eicosanoides.

Os eicosanoides também estão envolvidos na regulação da interação entre as células hematopoiéticas e o microambiente da medula óssea. Eles podem modular a expressão de moléculas de adesão celular e fatores de crescimento, influenciando a migração, aderência e sobrevivência das células progenitoras na medula óssea (ZHANG et al., 2015)

Dessa forma, os eicosanoides desempenham um papel complexo e variado na hematopoiese, regulando a produção, diferenciação e sobrevivência das células sanguíneas. O desequilíbrio na produção ou resposta aos eicosanoides pode ter consequências significativas na homeostase hematopoiética e estar associado a distúrbios hematológicos e doenças inflamatórias.

Além disso, com exceção dos eritrócitos, todas as células de mamíferos têm a capacidade de sintetizar eicosanoides (CALDER, 2020) e uma vez que todas as células do corpo estão sujeitas aos efeitos do metabolismo do etanol, é possível que outros órgãos e tecidos também apresentem um aumento na síntese de eicosanoides devido ao consumo crônico de etanol, o que pode comprometer o controle adequado dos processos inflamatórios.

A observação de um aumento significativo na abundância de eicosanoides, com um *fold change* de até três vezes, na medula óssea dos animais tratados com

etanol sugere um efeito pronunciado nessa via metabólica. A investigação dos efeitos biológicos desse aumento diferencial pode fornecer informações sobre os mecanismos pelos quais o metabolismo do álcool compromete as células da medula óssea e influencia a programação funcional do sistema imunológico em pacientes alcoolistas.

A metabolômica *untargeted* é um tipo de abordagem que tem como limitação a acurácia na identificação dos metabólitos, por isso as interpretações biológicas devem ser feitas em níveis mais abrangentes como classes químicas. Embora tenha essa limitação, esse tipo de estudo é valioso para abordagens exploratórias que tem como objetivo gerar hipóteses e direcionar pesquisas futuras que busquem elucidar mecanismos (SCHRIMPE-RUTLEDGE et al., 2016).

A identificação putativa dos compostos foi baseada na relação massa:carga (mz) médio dos *molecular features*, nas possíveis fórmulas moleculares e padrões isotópicos avaliando-se também se a identificação predita apresenta sentido biológico de acordo com a espécie e tecido estudado. A presença de múltiplos compostos da mesma via metabólica, como observado neste estudo, aumenta a confiança na identificação.

Uma estratégia adotada que fortalece as hipóteses propostas foi a utilização de plataformas analíticas complementares, bem como abordagens metabolômicas distintas com solventes de extração com características complementares (JEPPESEN; POWERS, 2023). Neste estudo, foram utilizadas as plataformas analíticas de GC-MS e LC-MS, juntamente com duas abordagens diferentes para o LC-MS, as quais confirmaram e complementaram o efeito do metabolismo do etanol em diversas classes químicas de lipídios, como fosfolipídios, ácidos graxos e eicosanoides.

A análise geral dos resultados obtidos por meio das três abordagens levou à formulação da hipótese apresentada na figura 14. Sugerimos que o efeito direto do etanol ou de seus metabólitos no metabolismo de lipídios pode estar relacionado ao fato de o etanol ser utilizado como substrato energético preferencial pelas células da medula óssea. A identificação de intermediários da via glicolítica, do lactato, lipoamida e do succinato, sustentam essa suposição. Além disso, a presença da glutatona e seus derivados identificados nos estudos indicam que essas células estão metabolizando o álcool e lidando com o estresse oxidativo gerado pelo metabolismo dessa molécula.

A maior abundância de malonil CoA sugere que o citrato, proveniente do ciclo de Krebs, está sendo transportado para o citoplasma e convertido em malonil CoA, o que leva à biossíntese de ácidos graxos e fosfolípidios. O efeito do etanol na fosfolipase A, de acordo com a literatura, e o aumento de precursores de ácido araquidônico observados neste estudo explicam o impacto no metabolismo do ácido araquidônico e, conseqüentemente, a maior abundância de eicosanoides. Estudos na literatura demonstram que a regulação da peroxidação lipídica e a síntese e liberação de ácidos graxos precursores, como observado aqui, podem afetar a formação geral de eicosanoides (PARANTAINEN, 1983)

A confirmação das identificações de metabólitos-chave das vias bioquímicas identificadas como impactadas pela administração crônica de etanol por meio de um estudo metabólico *targeted* e/ou validação funcional podem ser estratégias utilizadas para testar as hipóteses postuladas neste estudo.

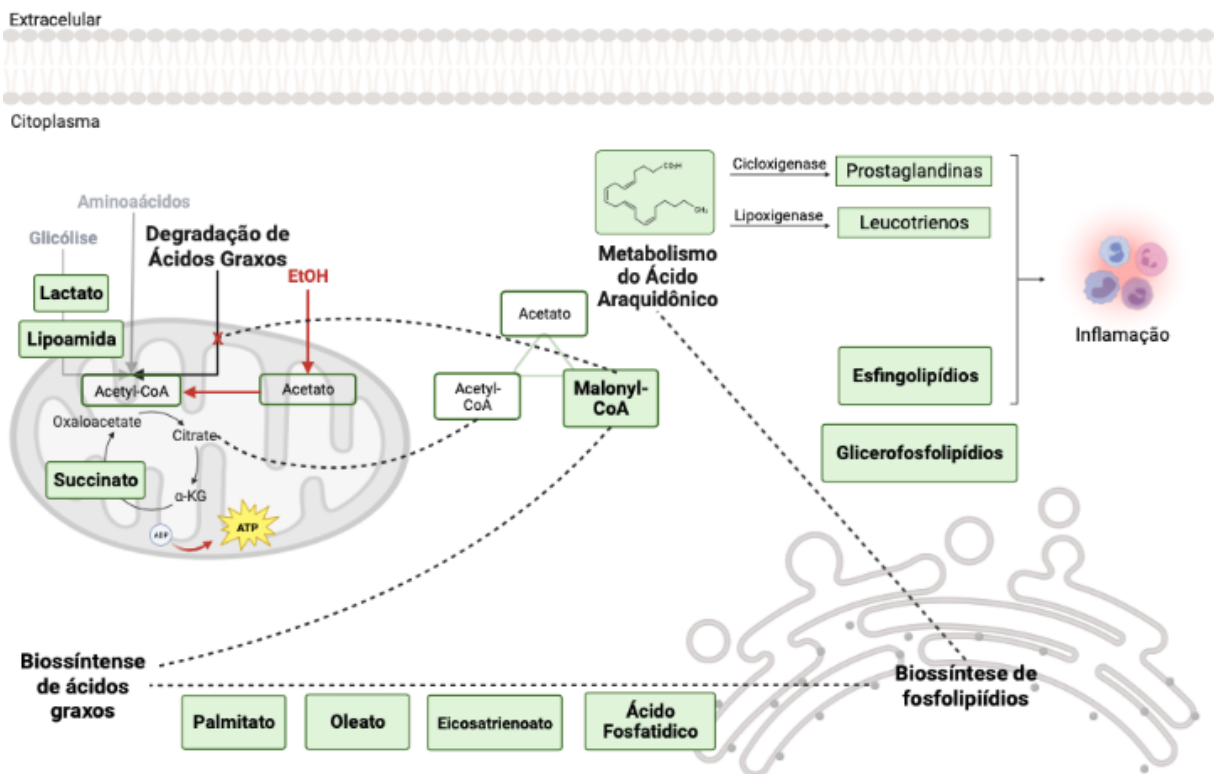


Figura 14. Hipótese proposta a partir dos resultados encontrados através das três abordagens metabômicas. O metabolismo do etanol impacta a síntese de ATP na medula óssea, resultando em uma diminuição da oxidação lipídica e no acúmulo de citrato. Esse citrato é transportado da mitocôndria para o citoplasma, juntamente com o acetato, que é o produto final do metabolismo do etanol. Ambos são convertidos em acetil-CoA, que por sua vez é convertido em malonil-CoA, iniciando assim a biossíntese de ácidos graxos. Essa biossíntese de ácidos graxos leva a uma alteração na abundância de metabólitos, indicando uma biossíntese de fosfolípidios no retículo endoplasmático. Isso, por sua vez, resulta em um aumento na abundância de glicerofosfolípidios, esfingolípídios e eicosanoides, que desempenham um papel na modulação da inflamação. Os retângulos preenchidos em verde

representam os metabólitos identificados neste estudo, que sustentam a hipótese proposta. As vias em negrito foram enriquecidas e/ou impactadas nas análises estatísticas. Criado com Biorender.

7. CONCLUSÃO

A administração crônica de etanol resulta em alterações no metaboloma da medula óssea, manifestadas por uma abundância diferencial de metabólitos relacionados ao metabolismo lipídico. Esses metabólitos desempenham diversas funções, como armazenamento energético, formação de membranas celulares, sinalização celular e processos inflamatórios. Essas descobertas sugerem que o metabolismo do etanol pode criar uma desregulação do metabolismo lipídico no ambiente medular podendo afetar a ativação, proliferação e diferenciação das células da medula óssea. Isso, por sua vez, pode impactar a programação funcional do sistema imunológico.

8. PERSPECTIVAS

Como mencionado anteriormente, a abordagem metabolômica não direcionada é uma ferramenta valiosa para estudos exploratórios, onde o objetivo é gerar hipóteses e direcionar pesquisas futuras. Os resultados obtidos neste estudo destacaram a importância de compreender os mecanismos pelos quais o metabolismo do etanol afeta a medula óssea. Esses resultados e hipóteses propostas abrem novas perspectivas para estudos futuros relacionados ao metabolismo do etanol e seus efeitos no sistema imunológico. Abaixo estão algumas possíveis direções para pesquisas adicionais:

1. Validação funcional: A validação funcional das hipóteses propostas neste estudo pode ser realizada por meio de experimentos *in vitro* e *in vivo*, além de um novo estudo metabolômico direcionado aos metabólitos-chave, como malonil CoA, ácido fosfatídico, ceramidas, esfingosina-1-fosfato, ácido araquidônico, prostaglandinas e leucotrienos. Esses metabólitos também podem ser utilizados em ensaios de cultura de células e modelos animais para

confirmar os efeitos biológicos do metabolismo do etanol na programação funcional do sistema imunológico.

2. Avaliar o efeito do consumo crônico de etanol na hematopoiese: Os resultados obtidos indicam que o metabolismo do etanol tem implicações na modulação da atividade proliferativa das células na medula óssea. A abordagem realizada por citometria de fluxo neste estudo revelou que o metabolismo do etanol não afeta o perfil geral de células na medula, mas impacta a quantidade de células de algumas populações. Um estudo mais detalhado para avaliar o efeito do metabolismo do etanol em populações de células específicas deste tecido se mostrou relevante para elucidar como a administração crônica de álcool afeta a hematopoiese.
3. Investigação da resposta inflamatória: Dado que os eicosanoides e os esfingolípídios bioativos, ceramidas e esfingosina-1-fosfato, desempenham papéis importantes na resposta inflamatória, estudos adicionais podem explorar o efeito do consumo crônico de etanol na regulação da inflamação na medula óssea e em diferentes tecidos e órgãos que compõem a rede interativa do sistema imunológico. Isso pode envolver a avaliação dos níveis tanto de eicosanoides e dos esfingolípídios como outros marcadores de inflamação em modelos animais.
4. Estudos clínicos: A realização de estudos clínicos pode fornecer informações sobre os efeitos do consumo crônico de etanol em populações humanas. Esses estudos podem envolver a análise de amostras biológicas de pacientes alcoolistas, buscando avaliar se o fenótipo observado neste estudo se manifesta em humanos. Essa abordagem permitirá uma melhor compreensão da relevância clínica dos achados obtidos e sua aplicabilidade no contexto da saúde humana.

Essas perspectivas de estudos futuros visam aprofundar o conhecimento sobre os efeitos do consumo crônico de etanol no sistema imunológico. A validação funcional,

a investigação da resposta inflamatória e os estudos clínicos são importantes para obter uma compreensão mais completa dos mecanismos subjacentes e dos efeitos do consumo crônico de etanol em diferentes níveis, desde o nível molecular até o nível populacional. Essas abordagens podem fornecer informações relevantes para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas e intervenções direcionadas para minimizar os efeitos adversos do consumo crônico de etanol na saúde humana.

9. REFERÊNCIAS

- AL-KHAMI, A. A.; RODRIGUEZ, P. C.; OCHOA, A. C. Energy metabolic pathways control the fate and function of myeloid immune cells. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 102, n. 2, p. 369–380, 2017.
- ALLENDE, M. L. et al. S1P1 receptor directs the release of immature B cells from bone marrow into blood. **The Journal of experimental medicine**, v. 207, n. 5, p. 1113–1124, maio 2010.
- ANDRADE, A. G. DE. Álcool E a Saúde Dos Brasileiros: Panorama 2019. p. 104, 2019.
- ANDREA, S. M. B.; GRUNDY. STUDIES ON THE PATHOGENESIS OF ALCOHOL-INDUCED SIDEROBLASTIC BONE MARROW ABNORMALITIES. **The New England Journal of Medicine**, p. 1244–1248, 1988.
- ANDRÉS-IGLESIAS, C. et al. Mass spectrometry-based metabolomics approach to determine differential metabolites between regular and non-alcohol beers. **Food Chemistry**, v. 157, p. 205–212, 2014.
- BALLARD, H. S. Alcohol-associated pancytopenia with hypocellular bone marrow. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 73, n. 6, p. 830–834, 1980.
- BARR, T. et al. Opposing effects of alcohol on the immune system. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, v. 65, p. 242–251, fev. 2016.
- BECKER, K. A. et al. Acid sphingomyelinase inhibitors normalize pulmonary ceramide and inflammation in cystic fibrosis. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 42, n. 6, p. 716–724, jun. 2010.
- BULLUCK, H.; HAUSENLOY, D. J. Modulating NAD⁺ metabolism to prevent acute kidney injury. **Nature Medicine**, v. 24, n. 9, p. 1306–1307, 2018.
- CALDER, P. C. Eicosanoids. **Essays in biochemistry**, v. 64, n. 3, p. 423–441, set. 2020.
- CANUTO, G. A. B. et al. Multi-analytical platform metabolomic approach to study miltefosine mechanism of action and resistance in Leishmania. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406, n. 14, p. 3459–3476, 2014.
- CANUTO, G. A. B. et al. Metabolômica: Definições, Estado-Da-Arte E Aplicações Representativas. **Quimica Nova**, v. 41, n. 1, p. 75–91, 2018.
- CASARES, D.; ESCRIBÁ, P. V; ROSSELLÓ, C. A. Membrane Lipid Composition:

Effect on Membrane and Organelle Structure, Function and Compartmentalization and Therapeutic Avenues. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 9, maio 2019.

- CELLS, M. S. T ISSUE -SPECIFIC STEM CELLS Chronic High Dose Alcohol Induces Osteopenia via Activation of mTOR Signaling in Bone Marrow. v. 1, 2016.
- DI MINNO, A. et al. The evolving landscape of untargeted metabolomics. **Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD**, v. 31, n. 6, p. 1645–1652, jun. 2021.
- DI PAOLO, G.; DE CAMILLI, P. Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. **Nature**, v. 443, n. 7112, p. 651–657, out. 2006.
- DOUGLASS, C. C.; TWOMEY, J. J. Transient stomatocytosis with hemolysis: a previously unrecognized complication of alcoholism. **Annals of internal medicine**, v. 72, n. 2, p. 159–164, 1970.
- DUPUIS, F. et al. Effects of lipidic mediators on the growth of human myeloid and erythroid marrow progenitors. **Journal of Lipid Mediators and Cell Signalling**, v. 16, n. 3, p. 117–125, 1997.
- FILLMORE, N. et al. Effect of fatty acids on human bone marrow mesenchymal stem cell energy metabolism and survival. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–17, 2015.
- FOSTER, D. W. Malonyl-CoA: the regulator of fatty acid synthesis and oxidation. **The Journal of clinical investigation**, v. 122, n. 6, p. 1958–1959, jun. 2012.
- GAULT, C. R.; OBEID, L. M.; HANNUN, Y. A. An overview of sphingolipid metabolism: from synthesis to breakdown. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 688, p. 1–23, 2010.
- GRANT, B. F. et al. Epidemiology of DSM-5 Alcohol Use Disorder: Results From the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions III. **JAMA psychiatry**, v. 72, n. 8, p. 757–766, ago. 2015.
- GUERRA, A. et al. **ÁLCOOL E A SAÚDE DOS BRASILEIROS CISA-Centro de Informações Sobre Saúde e Álcool PRESIDENTE EXECUTIVO REVISÃO DE TEXTO Potira Cunha FICHA CATALOGRÁFICA CENTRO DE INFORMAÇÕES SOBRE SAÚDE E ÁLCOOL-CISA**. [s.l: s.n.].
- GURKAN, U. A.; AKKUS, O. The mechanical environment of bone marrow: A review. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 36, n. 12, p. 1978–1991, 2008.
- HALSTED, C. H. Folate deficiency in alcoholism. **The American journal of clinical**

- nutrition**, v. 33, n. 12, p. 2736–2740, dez. 1980.
- HAMMER, J. H. et al. **Global status report on alcohol and health 2018**. [s.l: s.n.]. v. 65
- HANKIN, J. A.; CLAY, C. E.; MURPHY, R. C. The effects of ethanol and acetaldehyde on the metabolism of prostaglandin E2 and leukotriene B4 in isolated rat hepatocytes. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 285, n. 1, p. 155–161, abr. 1998.
- HARRIGAN, G. G.; MAGUIRE, G.; BOROS, L. Metabolomics in alcohol research and drug development. **Alcohol Research and Health**, v. 31, n. 1, p. 26–35, 2008.
- HAWKINS, P. T.; STEPHENS, L. R. PI3K signalling in inflammation. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1851, n. 6, p. 882–897, jun. 2015.
- HINTON, D. J. et al. Metabolomics biomarkers to predict acamprosate treatment response in alcohol-dependent subjects. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–8, 2017.
- HO, L. et al. Regional distribution of cyclooxygenase-2 in the hippocampal formation in Alzheimer's disease. **Journal of neuroscience research**, v. 57, n. 3, p. 295–303, ago. 1999.
- HYOCHOL AHN, PHD, MICHAEL WEAVER, PHD, DEBRA LYON, PHD, EUNYOUNG CHOI, RN, AND ROGER B. FILLINGIM, P. Ethanol and Other Short-Chain Alcohols. **Physiology & behavior**, v. 176, n. 10, p. 139–148, 2017.
- JEPPESEN, M. J.; POWERS, R. Multiplatform untargeted metabolomics. **Magnetic resonance in chemistry : MRC**, abr. 2023.
- KAHLER-QUESADA, A. M. et al. HHS Public Access. v. 43, n. 12, p. 2494–2503, 2020.
- KANY, S.; JANICOVA, A.; RELJA, B. Innate immunity and alcohol. **Journal of Clinical Medicine**, v. 8, n. 11, 2019.
- KELLIE, S.; AL-MANSOUR, Z. Overview of the Immune System. **Micro- and Nanotechnology in Vaccine Development**, v. 357, p. 63–81, 2017.
- LATVALA, J.; PARKKILA, S.; NIEMELÄ, O. Excess Alcohol Consumption Is Common in Patients with Cytopenia: Studies in Blood and Bone Marrow Cells. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 28, n. 4, p. 619–624, 2004.
- LE DARÉ, B.; LAGENTE, V.; GICQUEL, T. Ethanol and its metabolites: update on toxicity, benefits, and focus on immunomodulatory effects. **Drug Metabolism Reviews**, v. 51, n. 4, p. 545–561, 2019a.

- LE DARÉ, B.; LAGENTE, V.; GICQUEL, T. Ethanol and its metabolites: update on toxicity, benefits, and focus on immunomodulatory effects. **Drug metabolism reviews**, v. 51, n. 4, p. 545–561, nov. 2019b.
- LEUTI, A. et al. Bioactive lipids, inflammation and chronic diseases. **Advanced drug delivery reviews**, v. 159, p. 133–169, 2020.
- LEWIS, A. C. et al. Ceramide-induced integrated stress response overcomes Bcl-2 inhibitor resistance in acute myeloid leukemia. **Blood**, v. 139, n. 26, p. 3737–3751, jun. 2022.
- LIU, Y. K. Leukopenia in alcoholics. **The American Journal of Medicine**, v. 54, n. 5, p. 605–610, 1973.
- LU, W. et al. Metabolite measurement: Pitfalls to avoid and practices to follow. **Annual Review of Biochemistry**, v. 86, p. 277–304, 2017.
- MALACCO, N. L. S. DE O. et al. Chronic ethanol consumption compromises neutrophil function in acute pulmonary aspergillus fumigatus infection. **eLife**, v. 9, p. 1–23, 2020.
- MANNA, S. K. et al. Identification of noninvasive biomarkers for alcohol-induced liver disease using urinary metabolomics and the ppara -null mouse. **Journal of Proteome Research**, v. 9, n. 8, p. 4176–4188, 2010.
- MATLOUBIAN, M. et al. Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. **Nature**, v. 427, n. 6972, p. 355–360, jan. 2004.
- MICHAELS, M.; MADSEN, K. L. Immunometabolism and microbial metabolites at the gut barrier: Lessons for therapeutic intervention in inflammatory bowel disease. **Mucosal immunology**, v. 16, n. 1, p. 72–85, fev. 2023.
- MOLINA, P. E. et al. Focus on: Alcohol and the immune system. **Alcohol Research and Health**, v. 33, n. 1–2, p. 97–108, 2010.
- MONTINE, T. J. et al. Elevated CSF prostaglandin E2 levels in patients with probable AD. **Neurology**, v. 53, n. 7, p. 1495–1498, out. 1999.
- MOROS, G. et al. Investigation of the derivatization conditions for GC-MS metabolomics of biological samples. **Bioanalysis**, v. 9, n. 1, p. 53–65, 2017.
- NIAAA. Epigenetics: A New Frontier for Alcohol Research In. **Nih**, v. 86, n. 58, p. 1–6, 2002.
- OBINATA, H.; HLA, T. Sphingosine 1-phosphate and inflammation. **International**

- Immunology**, v. 31, n. 9, p. 617–625, 2019.
- OHMORI, S. et al. Effects of ethyl alcohol ingestion on the disturbance of porphyrin metabolism by lead. **Japanese Journal of Industrial Health**, v. 30, n. 2, p. 97–111, 1988.
- ONG, H.-H. et al. Genetic polymorphisms of alcohol-metabolizing enzymes and their association with alcoholism risk, personality and anthropometric traits among Malaysian university students. **Psychology, health & medicine**, v. 23, n. 2, p. 160–170, fev. 2018.
- PAFFENBARGER, R. S. J. et al. The New England Journal of Medicine Downloaded from nejm.org at MONASH UNIVERSITY LIBRARY on May 1, 2014. For personal use only. No other uses without permission. From the NEJM Archive. Copyright © 2009 Massachusetts Medical Society. All rights reserved. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 314, n. 7, p. 605–613, 1994.
- PAQUOT, N. [The metabolism of alcohol]. **Revue medicale de Liege**, v. 74, n. 5–6, p. 265–267, maio 2019.
- PARANTAINEN, J. Prostaglandins in alcohol intolerance and hangover. **Drug and alcohol dependence**, v. 11, n. 3–4, p. 239–248, jun. 1983.
- PASALA, S.; BARR, T.; MESSAOUDI, I. Impact of Alcohol Abuse on the Adaptive Immune System. **Alcohol research : current reviews**, v. 37, n. 2, p. 185–197, 2015.
- POST, R. M.; DESFORGES, J. F. Thrombocytopenia and alcoholism. **Annals of internal medicine**, v. 68, n. 6, p. 1230–1236, 1968.
- QUAYE, I. K. et al. Biochemical and haematological markers of alcohol intake in Ghanaians. **West African journal of medicine**, v. 11, n. 3, p. 199–202, 1992.
- ROBERTS, N. A. **Immunology: An Illustrated Outline. The Yale Journal of Biology and Medicine**, set. 2014.
- S., HAROLD BALLARD, M. D. The Hematological Complications of Alcoholism. **Nevrologiya, Neiropsikhiatriya, Psikhosomatika**, v. 21, n. 1, p. 42–52, 1997.
- SADIKU, P. et al. Neutrophils Fuel Effective Immune Responses through Gluconeogenesis and Glycogenesis. **Cell Metabolism**, v. 33, n. 2, p. 411–423.e4, 2021.
- SANTERRE, J. L. et al. Cytoplasmic phospholipase A₂ modulation of adolescent rat ethanol-induced protein kinase C translocation and behavior. **Neurochemical**

- research**, v. 40, n. 5, p. 1023–1031, maio 2015.
- SARKAR, D.; JUNG, M. K.; WANG, H. J. Alcohol and the immune system. **Alcohol Research: Current Reviews**, v. 37, n. 2, p. 153–155, 2015.
- SCHRIMPE-RUTLEDGE, A. C. et al. Untargeted Metabolomics Strategies—Challenges and Emerging Directions. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 27, n. 12, p. 1897–1905, 2016.
- SEAGER, S. L.; SLABAUGH, M. R. **Structure and Function of Fatty Acids**. [s.l.: s.n.].
- SHI, XIN; DELUCIA, ANGELO L; BAO, JIANXIN; ZHANG, P. Alcohol Abuse and Disorder of Granulopoiesis. **Physiology & behavior**, v. 63, n. 8, p. 1–18, 2019.
- SHI, X. et al. Alcohol abuse and disorder of granulopoiesis. **Pharmacology & therapeutics**, v. 198, p. 206–219, jun. 2019.
- SIM, S. S. et al. The involvement of phospholipase A(2) in ethanol-induced gastric muscle contraction. **European journal of pharmacology**, v. 413, n. 2–3, p. 281–285, fev. 2001.
- SIMONS, K.; IKONEN, E. Functional rafts in cell membranes. **Nature**, v. 387, n. 6633, p. 569–572, jun. 1997.
- SOUSA, M. C. DE et al. Influence of Chronic Alcohol Use on Osteoblastic Differentiation of Bone Marrow Cells , Bone Properties , and Hepatic and Renal Morphology of Rats. v. 2018, 2018.
- STUBBS, C. D. et al. Ethanol-induced modifications to membrane lipid structure: effect on phospholipase A2-membrane interactions. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 262, n. 2, p. 560–573, maio 1988.
- SZABO, G.; SAHA, B. Alcohol's effect on host defense. **Alcohol Research: Current Reviews**, v. 37, n. 2, p. 159–170, 2015.
- TRAVLOS, G. S. Normal structure, function, and histology of the bone marrow. **Toxicologic pathology**, v. 34, n. 5, p. 548–565, 2006.
- VAN DEN BOSSCHE, J.; HORNG, T.; RYAN, D. G. **Immunometabolism at the basis of health and disease; an editorial. Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease** Netherlands, abr. 2023.
- VILLAS-BÔAS, S. G.; BRUHEIM, P. The potential of metabolomics tools in bioremediation studies. **OMICS A Journal of Integrative Biology**, v. 11, n. 3, p. 305–313, 2007.
- WENK, M. R. Lipidomics: new tools and applications. **Cell**, v. 143, n. 6, p. 888–895,

dez. 2010.

- WICKRAMASINGLE, S. N.; SLOVIER, A. N. B. H. A.; SAUNDERS, J. E. Metabolism Ethanol by Human Bone Marrow Cells. **Acta Haematologica**, v. 66, p. 238–243, 1981.
- YOU, M.; ARTEEL, G. E. Effect of ethanol on lipid metabolism. **Journal of Hepatology**, v. 70, n. 2, p. 237–248, 2019a.
- YOU, M.; ARTEEL, G. E. Effect of ethanol on lipid metabolism. **Journal of hepatology**, v. 70, n. 2, p. 237–248, fev. 2019b.
- YOUNG, S. A. et al. Sphingolipid and ceramide homeostasis: Potential therapeutic targets. **Biochemistry Research International**, v. 2012, 2012.
- ZAKHARI, S. Overview: How is alcohol metabolized by the body? **Alcohol Research and Health**, v. 29, n. 4, p. 245–254, 2006.
- ZAKHARI, S. Alcohol metabolism and epigenetics changes. **Alcohol Research: Current Reviews**, v. 35, n. 1, p. 6–16, 2012.
- ZHANG, J. et al. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. **Nature**, v. 425, n. 6960, p. 836–841, out. 2003.
- ZHANG, Y. et al. TISSUE REGENERATION. Inhibition of the prostaglandin-degrading enzyme 15-PGDH potentiates tissue regeneration. **Science (New York, N.Y.)**, v. 348, n. 6240, p. aaa2340, jun. 2015.
- ZIEVE, L. HEMOLYTIC ANEMIA IN LIVER DISEASE. **Medicine**, v. 45, n. 497–505, 1966.

10. ANEXOS

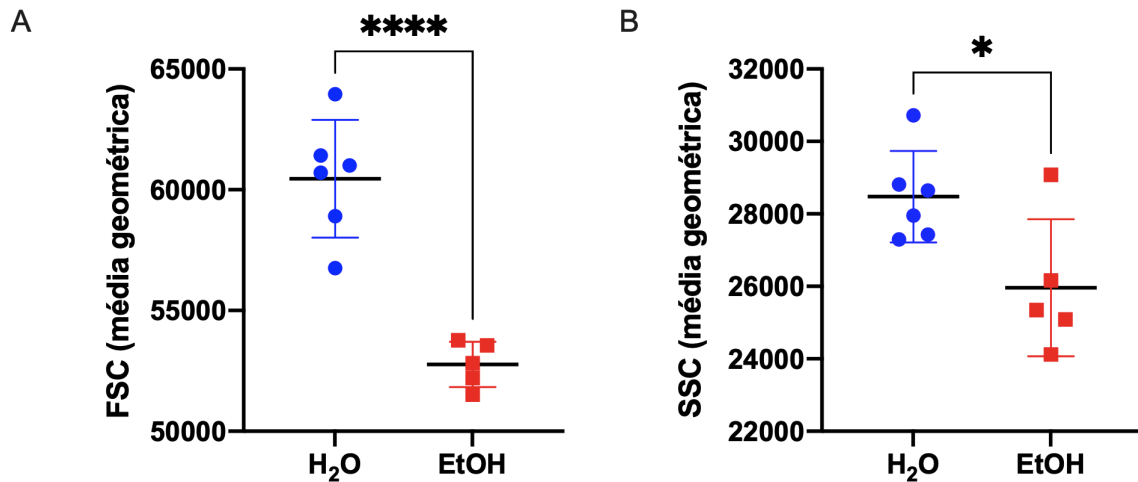


Figura 15. Análise do tamanho e complexidade das células da medula provenientes de animais sob administração crônica de etanol (EtOH) e grupo controle tratado com água (H₂O) por citometria de fluxo. FSC-A representa a discriminação por tamanho das células enquanto SSC-A representa a discriminação por complexidade das células. A medula óssea foi obtida a partir do fêmur de 6 animais por grupo utilizando BSA com 1% de PBS e submetidas a análises por citometria de fluxo no citômetro FACSCanto II (Becton Dickinson). Após exclusão de debris e *singlets* os dados de média geométrica foram obtidos. A análise estatística e os gráficos foram conduzidos no software Graph Pad Prism 8. A diferença entre os grupos foi analisada pelo *Test T Student*. (A) Análises de tamanho (SSC) utilizando a média geométrica ($p < 0.0001$) e (B) análise de complexidade (SSC) utilizando a média geométrica ($p < 0.02$).



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Caracterização dos efeitos imunomodulatórios gerados pela alteração de metabolismo celular durante consumo crônico de etanol", protocolo do CEUA: 337/2018 sob a responsabilidade de Frederico Marianetti Soriani que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 12/11/2018.

| | |
|--------------------------|---------------------------------|
| Vigência da Autorização | 12/11/2018 a 11/11/2023 |
| Finalidade | Pesquisa |
| *Espécie/linhagem | Camundongo isogênico / C57BL/6J |
| Nº de animais | 7 |
| Peso/Idade | 20g / 5(semanas) |
| Sexo | masculino |
| Origem | Biotério Central da UFMG |
| *Espécie/linhagem | Camundongo isogênico / C57BL/6J |
| Nº de animais | 7 |
| Peso/Idade | 20g / 5(semanas) |
| Sexo | masculino |
| Origem | Biotério Central da UFMG |
| *Espécie/linhagem | Camundongo isogênico / C57BL/6J |
| Nº de animais | 7 |
| Peso/Idade | 20g / 5(semanas) |
| Sexo | masculino |
| Origem | Biotério Central da UFMG |
| *Espécie/linhagem | Camundongo isogênico / C57BL/6J |
| Nº de animais | 7 |
| Peso/Idade | 20g / 5(semanas) |
| Sexo | masculino |
| Origem | Biotério Central da UFMG |
| *Espécie/linhagem | Camundongo isogênico / C57BL/6J |
| Nº de animais | 7 |

| | |
|--------------------------|---------------------------------|
| Peso/Idade | 20g / 5(semanas) |
| Sexo | masculino |
| Origem | Biotério Central da UFMG |
| *Espécie/linhagem | Camundongo isogênico / C57BL/6J |
| Nº de animais | 7 |
| Peso/Idade | 20g / 5(semanas) |
| Sexo | masculino |
| Origem | Biotério Central da UFMG |
| *Espécie/linhagem | Camundongo isogênico / C57BL/6J |
| Nº de animais | 7 |
| Peso/Idade | 20g / 5(semanas) |
| Sexo | masculino |
| Origem | Biotério Central da UFMG |
| *Espécie/linhagem | Camundongo isogênico / C57BL/6J |
| Nº de animais | 7 |
| Peso/Idade | 20g / 5(semanas) |
| Sexo | masculino |
| Origem | Biotério Central da UFMG |
| *Espécie/linhagem | Camundongo isogênico / C57BL/6J |
| Nº de animais | 7 |
| Peso/Idade | 20g / 5(semanas) |
| Sexo | masculino |
| Origem | Biotério Central da UFMG |
| *Espécie/linhagem | Camundongo isogênico / C57BL/6J |
| Nº de animais | 7 |
| Peso/Idade | 20g / 5(semanas) |
| Sexo | masculino |
| Origem | Biotério Central da UFMG |

| | |
|--|---------------------------------|
| Dados dos animais agrupados (uso do biotério) | |
| *Espécie/linhagem | Camundongo isogênico / C57BL/6J |
| Nº de animais | 84 |
| Idade | 5(semanas) |
| Sexo | masculino |
| Origem | Biotério Central da UFMG |

Considerações posteriores:

| | |
|------------|---|
| 12/11/2018 | Aprovado com recomendação na reunião do dia 12/11/2018. Validade: 12/11/2018 à 11/11/2023 Recomendação: O biotério de acomodação e experimentação (Biotério de Experimentação do Departamento de Biologia Geral) não está credenciado no sistema CIUCA. |
|------------|---|

Belo Horizonte, 09/06/2023.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_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) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br