

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA, ECOLOGIA E EVOLUÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



TESE DE DOUTORADO

**Avaliação do efeito do consumo crônico de etanol no sistema imune:
disbiose, mecanismos inflamatórios e resolução da inflamação durante
infecção pulmonar por *Aspergillus fumigatus***

Nathália Luísa Sousa de Oliveira Malacco

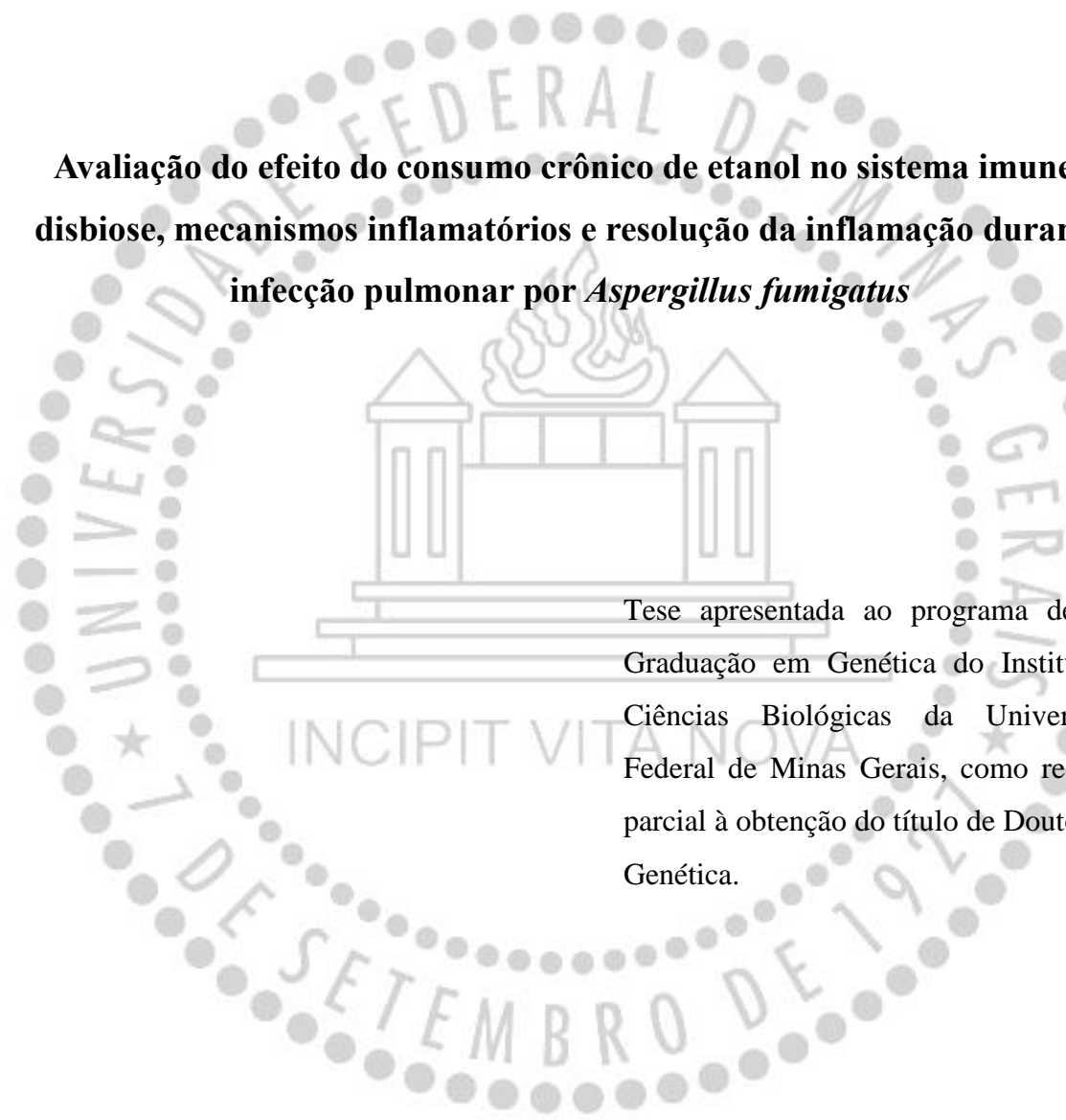
ORIENTADOR: Prof. Dr. Frederico Marianetti Soriani

BELO HORIZONTE

JANEIRO – 2021

NATHÁLIA LUÍSA SOUSA DE OLIVEIRA MALACCO

**Avaliação do efeito do consumo crônico de etanol no sistema imune:
disbiose, mecanismos inflamatórios e resolução da inflamação durante
infecção pulmonar por *Aspergillus fumigatus***



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

ORIENTADOR: Prof. Dr. Frederico Marianetti Soriani

BELO HORIZONTE

JANEIRO - 2021

043

Malacco, Nathália Luísa Sousa de Oliveira.

Avaliação do efeito do consumo crônico de etanol no sistema imune: disbiose, mecanismos inflamatórios e resolução da inflamação durante infecção pulmonar por *Aspergillus fumigatus* [manuscrito] / Nathália Luísa Sousa de Oliveira Malacco. - 2021.

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

Orientador: Prof. Dr. Frederico Marianetti Soriani.

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

1. Etanol. 2. Alcoolismo. 3. Pneumopatias Fúngicas. 4. Movimento Celular. 5. *Aspergillus fumigatus*. 6. Neutrófilos. 7. Disbiose. 8. Receptores de Interleucina-8B. 9. Sistema Imunitário. I. Soriani, Frederico Marianetti. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 575



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

ATA DE DEFESA DE TESE

ATA DA DEFESA DE TESE	136/2021
Nathalia Luisa Sousa de Oliveira Malacco	Entrada 1º/2016
	CPF: 094.568.236-01

Às treze horas do dia **25 de janeiro de 2021**, reuniu-se remotamente devido a pandemia do novo coronavírus (COVID 19), a Comissão Examinadora de Tese, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: "**Avaliação do efeito do consumo crônico de etanol no sistema imune: disbiose, mecanismos inflamatórios e resolução da inflamação durante infecção pulmonar por *Aspergillus fumigatus***", 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
Danielle da Glória de Souza	UFMG	033.633.746-90	APROVADA
Flávio Almeida Amaral	UFMG	051.832.106-16	APROVADA
Fernando Carvalho Lopes	McGill University	637.303.752-53	APROVADA
Patrícia Machado Rodrigues e Silva Martins	FioCruz Rio	768.330.117-53	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, 25 de janeiro de 2021.

Frederico Marianetti Soriani – Orientador

Danielle da Glória de Souza

Flávio Almeida Amaral

Fernando Carvalho Lopes

Patrícia Machado Rodrigues e Silva Martins

Assinaturas:



Documento assinado eletronicamente por **Frederico Marianetti Soriani, Professor do Magistério Superior**, em 25/01/2021, às 16:56, 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 **Flavio Almeida Amaral, Professor do Magistério Superior**, em 25/01/2021, às 17:10, 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 **Patrícia Machado Rodrigues e Silva Martins, Usuário Externo**, em 25/01/2021, às 22:24, 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 **Fernando Lopes, Usuário Externo**, em 26/01/2021, às 13:00, 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 **Daniele da Gloria de Souza, Professora do Magistério Superior**, em 26/01/2021, às 19:59, 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 **0532174** e o código CRC **590E5366**.



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

FOLHA DE APROVAÇÃO

"Avaliação do efeito do consumo crônico de etanol no sistema imune: disbiose, mecanismos inflamatórios e resolução da inflamação durante infecção pulmonar por *Aspergillus fumigatus*"

Nathalia Luisa Sousa de Oliveira Malacco

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Frederico Marianetti Soriani - Orientador

UFMG

Danielle da Glória de Souza

UFMG

Flávio Almeida Amaral

UFMG

Fernando Carvalho Lopes

McGill University

Patricia Machado Rodrigues e Silva Martins

FioCruz Rio

Belo Horizonte, 25 de janeiro de 2021.



Documento assinado eletronicamente por **Frederico Marianetti Soriani, Professor do Magistério Superior**, em 25/01/2021, às 16:56, 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 **Flavio Almeida Amaral, Professor do Magistério Superior**,



em 25/01/2021, às 17:10, 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 **Patricia Machado Rodrigues e Silva Martins, Usuário Externo**, em 25/01/2021, às 22:24, 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 **Fernando Lopes, Usuário Externo**, em 26/01/2021, às 12:59, 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 **Daniele da Gloria de Souza, Professora do Magistério Superior**, em 26/01/2021, às 19:59, 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?](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0)

[acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0532205** e o código CRC **FD784EE8**.

“É preciso força pra sonhar e perceber que a estrada vai além do que se vê”

Marcelo Camelo

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Minas Gerais.

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

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

À todas as pessoas do Centro de Pesquisa e desenvolvimento de Fármacos e do grupo Imunofarmacologia pelo suporte, companheirismo, solicitude, colaboração e ensinamentos.

Ao Professor Fernando, que me recebeu de braços abertos em seu laboratório e me proporcionou uma experiência incrível. Muito obrigada por tudo.

Agradeço ao meu orientador, Professor Dr. Frederico Soriani, por acreditar em mim há sete anos, quando bati à porta de seu laboratório. Obrigada pela oportunidade, pelos conselhos, pela confiança, pelo exemplo, pela amizade, e pela nossa parceria.

Às minhas queridas colegas de laboratório Isabella, Jéssica, Flávia, Karina e Tássia. Obrigada pela convivência, pelo carinho, apoio, correções, ajuda e por me ajudarem a fazer o dia-a-dia de trabalho ser leve e divertido.

Aos meus queridos amigos Alison, Ana Clara, Cathy, Elena, Fernanda, Juan, Mariana e Nina. Muito obrigada pelo carinho, pela força e por torcer por mim. Obrigada por fazerem parte da minha história.

Aos meus pais, Maria e Sílvio, aos meus irmãos, Ana, Sílvio e Victor e à toda minha família. Obrigada pelo amor, apoio e amparo nos momentos difíceis. Obrigada por tanto carinho e por se orgulharem de mim.

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

LISTA DE ABREVIATURAS

- ABPA** – Aspergilose broncopulmonar alérgica
- AI** – Aspergilose invasiva
- API** – Aspergilose pulmonar invasiva
- ADH** – Álcool desidrogenase
- ALDH** – Aldeído desidrogenase
- ANOVA** – Análise de variância
- ATP** – Adenosina trifosfato
- AUD** – Transtorno por uso de álcool (do inglês, *Alcohol use disorder*)
- BAL** – Lavado broncoalveolar (do inglês, *Bronchoalveolar lavage fluid*)
- BSA** – Albumina sérica bovina (do inglês, *bovine serum albumin*)
- CCL** – Quimiocina com o motivo C-C ligante
- CCR** – Receptor de quimiocinas CC
- CEUA** – Comissão de ética no uso de animais
- CXCL** – Quimiocina com o motivo C-X-C ligante 1
- CXCR2** – Receptor de quimiocinas CXC
- CYP2E1** – Citocromo microsomal P450 2E1
- DO** – Densidade óptica
- DAL** – Doença alcoólica hepática
- dL** – Decilitro
- DMS-5** – Manual diagnóstico dos transtornos mentais, quinta edição (do inglês, *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th*)
- DMSO** – Dimetilsulfóxido
- DNA** – Ácido desoxirribonucleico (do inglês, *deoxyribonucleic acid*)
- DPOC** – Doença pulmonar obstrutiva crônica
- ECAR** – Razão da acidificação extracelular (do inglês, *Extra Cellular Acidification Rate*)
- EDTA** – Ácido etilendiaminotetraacético
- ELISA** – Ensaio de imunoadsorção ligado a enzima (do inglês, *enzyme-linked immunosorbent assay*)
- fMLP** – N-formilmetionil-leucil-fenilalanina
- g** – Grama
- G-CSF** – Fator estimulador de colônias granulócitos (do inglês, *Granulocyte-colony stimulating factor*)

GILZ – Zíper de leucina induzido por glicocorticoide (do inglês, *Glucocorticoid-induced leucine zipper*)

GLUT – Transportador de glicose (do inglês, *glucose transporter*)

GM-CSF – Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (do inglês, *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*)

GPCR Receptor acoplado à proteína G (do inglês, *G protein-coupled receptors*)

GRK – Receptor de quinase acoplado à proteína G (do inglês, *G protein-coupled receptor kinase*)

HK – Hexoquinase

HTAB – Brometo de hexadeciltrimetilamônio

i.n. – Intranasal

i.p. – Intraperitoneal

IBD – Doença inflamatória intestinal (do inglês, *inflammatory bowel disease*)

IFN – Interferon

IL – Interleucina

ILT6 – Infecção latente pelo *Mycobacterium tuberculosis*

INPAD – Instituto Nacional de Ciência de Tecnologia para Políticas Públicas do Álcool e Outras Drogas

LDH – Lactato desidrogenase

LPS – Lipopolissacarídeo

MAPK – MAP Quinase (do inglês, *MAP kinase*)

MIP – Proteína inflamatória de macrófagos (do inglês, *macrophage inflammatory protein*)

MOI – Multiplicidade de infecção (do inglês, *multiplicity of infection*)

MPO – Mieloperoxidase

mRNA – RNA mensageiro

n – Nano

Na₂HPO₄ – Fosfato de sódio dibásico

NaCl – Cloreto de sódio

NaEDTA – Acetato dissódio tetraetilenodiamina

NAF – Fluoreto de sódio

NAG – N-acetilglicosaminidase

NET – Armadilha extracelular de neutrófilo (do inglês, *neutrophil extracellular trap*)

NFκB – Fator nuclear κ B (do inglês, *nuclear factor κ B*)

NLR – Receptores do tipo NOD – do inglês, *NOD-like receptors*

NSDUH – Do inglês, *National Survey on Drug Use and Health*

OCR – Razão do consumo de oxigênio (do inglês, *Oxygen Consumption Rate*)

OMS – Organização Mundial da Saúde

OPD – O-fenileno-diamina

OXPHOS – Fosforilação oxidativa (do inglês, *oxidative phosphorylation*)

p – Pico

p/v – Peso por volume

PAMP – padrões moleculares associados a patógenos (do inglês, *pathogen-associated molecular patterns*)

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

PGC – Polimerase gama mitocondrial

pH – Potencial hidrogeniônico

PLG – Proliferador do peroxissomo

PMN – Célula polimorfonuclear (do inglês, *Polymorphonuclear cells*)

PMSF – Fenilmetilsulfonilflúor

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

Ri – Índice de resolução (do inglês, *Resolution index*)

RNA – Ácido ribonucleico (do inglês, *ribonucleic acid*)

ROS – Espécies reativas de oxigênio (do inglês, *Reactive Oxygen Species*)

rpm – Rotações por minuto

SDRA – síndrome da dificuldade respiratória aguda

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

SPM – Mediadores especializados pró-resolutivos (do inglês, *Specialized pro-resolving mediators*)

TCA – Ácidos tricarbóxicos (do inglês, *tricarboxylic acid*)

TFAM – Fator de transcrição mitocondrial A (do inglês, *mitochondrial transcription factor A*)

TGF- β – Fator de transformação de crescimento β (do inglês, *transforming growth factor beta*)

TGI – Trato gastrointestinal

Th – Célula T auxiliar (do inglês, *T helper cell*)

TLR – Receptor do tipo Toll (do inglês, *Toll-like receptor*)

TMB – 3,3',-5,5'-tetrametilbenzidina

TNF- α – Fator de necrose tumoral (do inglês, *tumor necrosis factor*)

UFC – Unidade formadora de colônia

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

v/v – Volume por volume

VSR – vírus sincicial respiratório

YAG – Ágar glicose com extrato de levedura (do inglês, *Yeast extract-agar-glucose*)

LISTA DE FIGURAS

Introdução

- Figura 1.** Consumo de álcool puro no mundo (em litros) por pessoa com mais 15 anos em 2010..... 20
- Figura 2.** Vias de metabolismo do etanol..... 23
- Figura 3.** A capacidade de adaptação a diversas condições ambientais de *A. fumigatus* permite que ele cresça tanto no solo quanto no tecido pulmonar..... 30

Capítulo 3

- Figura 1.** Dinâmica entre a ativação e resolução da resposta inflamatória..... 78
- Figura 2.** O consumo de etanol causou alterações na cinética de recrutamento celular para o sítio infeccioso e pulmões frente ao *A. fumigatus*..... 87
- Figura 3.** O consumo crônico de etanol não altera a quantidade de leucócitos circulantes no sangue de camundongos após tratamento com etanol..... 88
- Figura 4.** O consumo de etanol altera a permeabilidade vascular nos camundongos... 89
- Figura 5.** O tratamento com etanol atrasou a resolução da resposta inflamatória nos camundongos..... 90
- Figura 6.** O consumo crônico de etanol altera o balanço de mediadores após infecção por *A. fumigatus*..... 92

Capítulo 4

- Figura 1.** Representação esquemática dos eventos da cascata de ativação e migração de neutrófilos para o tecido..... 95
- Figura 2.** Representação esquemática das vias de metabolismo energético..... 97
- Figura 3.** Viabilidade celular de neutrófilos expostos em diferentes concentrações de etanol..... 104
- Figura 4.** Capacidade fagocítica de neutrófilos expostos a diferentes concentrações de etanol..... 105
- Figura 5.** Neutrófilos expostos ao etanol fagocitam menos partículas de zimosan..... 106
- Figura 6.** Neutrófilos expostos ao etanol têm sua quimiotaxia reduzida..... 107
- Figura 7.** Imunofluorescência para expressão de CXCR2 em neutrófilos..... 108
- Figura 8.** Quantificação da intensidade de fluorescência para a marcação de CXCR2 em neutrófilos..... 109
- Figura 9.** Diminuição da expressão de CXCR2 em neutrófilos expostos a etanol..... 110

Figura 10. Expressão da proteína pP38 em neutrófilos expostos a etanol.....	112
Figura 11. Expressão da proteína pERK 1/2 em neutrófilos expostos a etanol.....	113
Figura 12. Captação de 2NBDG por neutrófilos expostos a etanol.....	115

Capítulo 5

Figura 1. O consumo de etanol altera a composição da microbiota indígena nos camundongos.....	121
Figura 2. O consumo de etanol altera os filos da microbiota indígena nos camundongos.....	123

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência dos iniciadores de rDNA do gene 16S usados na qPCR para filos bacterianos da microbiota.....	119
---	-----

RESUMO

O transtorno por uso de álcool é uma doença crônica e progressiva, debilitante e multifatorial. É caracterizado pela busca compulsiva por etanol e perda de controle em relação ao seu consumo. O consumo de etanol na população mundial é enorme e tem sido relacionado com uma maior susceptibilidade a infecções pulmonares, embora os mecanismos associados não são conhecidos. Além disso, dados sobre a relação entre o consumo de etanol e infecções fúngicas são escassos. O objetivo desse trabalho foi estudar os mecanismos envolvidos na interação patógeno-hospedeiro durante infecção pulmonar por *Aspergillus fumigatus* em hospedeiro consumista crônico de etanol. Camundongos C57BL/6 foram tratados com uma solução de etanol (20% v/v) ou receberam apenas água (controles) por 12 semanas e depois infectados, via intranasal, com o fungo. O lavado broncoalveolar, sangue e pulmões foram coletados. A infecção por *A. fumigatus* em animais sem nenhum tratamento, induziu uma resposta inflamatória robusta, caracterizada por produção de TNF- α , IL-1 β , CXCL1, CCL2 e IL-17 e pelo recrutamento de neutrófilos, macrófagos e linfócitos na fase inicial da infecção. Essa infecção tem caráter auto limitante, já que na sua fase tardia apresentou resolução espontânea, com a produção de IL-10 e TGF- β , redução do infiltrado inflamatório e aumento de apoptose e eferocitose. Após infecção por *A. fumigatus*, os camundongos consumistas de etanol apresentaram maior mortalidade associada à maior carga fúngica. O consumo de etanol causou falha na ativação, rolamento, adesão e migração de neutrófilos para o foco inflamatório. Os neutrófilos circulantes de animais que consumiram cronicamente etanol apresentaram menor expressão do receptor de quimiocinas CXCR2, o que explica a falha na migração dessa célula. Os neutrófilos de animais expostos cronicamente ao etanol também apresentam defeitos nas funções de fagocitose, produção de ROS e depuração fúngica. O consumo crônico de etanol causou diminuição do recrutamento de células e de citocinas e quimiocinas como TNF- α , IL-1 β , CXCL1, CXCL2, CCL2, IL-17, IL-10 e TGF- β , importantes para coordenar a resposta inflamatória em fases mais tardias da infecção por *A. fumigatus*, o que culminou no aumento no tempo de resolução da resposta inflamatória. *In vitro*, neutrófilos expostos ao etanol apresentaram fenótipos semelhantes ao modelo *in vivo*, com menor quimiotaxia, menor capacidade fagocítica e menor internalização do receptor CXCR2. Além disso, resultados preliminares demonstraram maior expressão de pERK após estímulo com CXCL1 nos neutrófilos expostas ao etanol. O consumo de etanol foi também um fator

crucial para a perturbação de populações bacterianas intestinais importantes, como o aumento do número de enterobactérias e diminuição da quantidade de bactérias ácido lácticas. Tomados em conjunto, os resultados mostraram que consumo crônico e a exposição ao etanol altera a resposta inflamatória e é prejudicial a importantes funções dos neutrófilos, causando maior susceptibilidade à infecção por *A. fumigatus*.

Palavras-chave: etanol, álcool, resposta inflamatória, neutrófilo, *Aspergillus fumigatus*, resolução, migração celular, disbiose.

ABSTRACT

Alcohol use disorder (AUD) is a chronic, progressive, debilitating, and multifactorial disease. AUD is characterized by compulsive ethanol use and loss of control over its intake. Ethanol consumption in world population is huge and it has been related to an increased susceptibility to pulmonary infections, although the underlying mechanisms are poorly understood. In addition, data linking chronic ethanol consumption and fungal infections are scarce. This work aimed to study the mechanisms involved in host-pathogen interaction during *Aspergillus fumigatus* lung infection in chronic ethanol host consumers. C57BL/6 mice were treated with an ethanol solution (20% v/v) or received only water (controls) for 12 weeks and infected intranasally with the fungus. Bronchoalveolar lavage fluid, blood and lungs were collected. *A. fumigatus* infection in mice without any treatment, induced a robust inflammatory response, characterized by the production of TNF- α , IL-1 β , CXCL1, CCL2 and IL-17 and neutrophils, macrophages and lymphocytes recruitment in the early stages of infection. This infection was self-limiting, since it resolved spontaneously and in its later stages of infection presented IL-10 and TGF- β production, reduction of the inflammatory infiltrate into lung tissue and increased apoptosis and efferocytosis. After *A. fumigatus* infection, ethanol-fed mice showed increased susceptibility to infection associated with greater fungal load. Ethanol consumption caused failure in the activation, rolling, adhesion and migration of neutrophils to the inflammatory site. Circulating neutrophils from mice that chronically consumed ethanol showed lower expression of the chemokine receptor CXCR2, which explains the failure of cell migration. Neutrophils from mice chronically exposed to ethanol also displayed defects in phagocytosis, ROS production and fungal clearance. Chronic ethanol consumption, caused decreased cell recruitment and imbalance in the release of cytokines and chemokines such as TNF- α , IL-1 β , CXCL1, CXCL2, CCL2, IL-17, IL-10 and TGF- β , important to coordinate the inflammatory response in later stages of *A. fumigatus* infection, which culminated in an increase in the time interval for resolving the inflammatory response. *In vitro*, ethanol-exposed neutrophils presented similar phenotype to the *in vivo* model, with lower chemotaxis and phagocytic capacity, and diminished internalization of the CXCR2 receptor. In addition, preliminary results demonstrated increased expression of pERK after CXCL1 stimulation in ethanol-exposed neutrophils. Ethanol consumption was also a crucial factor for disturbance of important intestinal bacterial populations, as the increase the number of enterobacteria and the

decrease the amount of lactic acid bacteria. Taken together, results showed that chronic consumption and exposure to ethanol altered inflammatory response and is harmful to important neutrophil functions, causing increased susceptibility to *A. fumigatus* infection.

Keywords: ethanol, alcohol, inflammatory response, neutrophil, *Aspergillus fumigatus*, resolution, cell migration, dysbiosis.

1 INTRODUÇÃO

1.1 O alcoolismo e a modulação da resposta imune

1.1.1 Álcool e alcoolismo

O álcool (álcool etílico ou etanol) é uma das drogas psicotrópicas que tem seu consumo admitido e até incentivado. Apesar de sua ampla aceitação social, o consumo de bebidas alcoólicas, quando em excesso, torna-se prejudicial tanto para o indivíduo quanto para a sociedade (AL-ABDALLAT et al., 2016; GILMORE et al., 2016).

A dependência e o abuso de álcool estão inclusos dentro do diagnóstico de Transtornos por Uso de Álcool (AUDs, do inglês, *Alcohol Use Disorders*), na quinta edição do Manual Diagnóstico e Estatístico dos Transtornos Mentais (DSM 5), lançado em maio de 2013. O transtorno por uso de álcool é dividido em três categorias: leve, moderado e grave. Para cada categoria são classificados diversos sintomas que podem causar efeitos colaterais graves. Caso a pessoa permaneça sem tratamento, qualquer um dos tipos de abuso de álcool pode entrar num ciclo vicioso fora de controle (NATIONAL INSTITUTE ON ALCOHOL AND ALCOHOLISM, 2013).

O alcoolismo, também conhecido como dependência de álcool e, mais recentemente, como transtorno por uso de álcool grave, é uma doença que está relacionada a um descontrole no consumo de álcool e é considerado uma doença crônica e progressiva, debilitante e multifatorial. É caracterizado como um conjunto de fenômenos comportamentais, cognitivos e fisiológicos que se desenvolvem após o consumo repetido de álcool. O consumo é tipicamente associado aos seguintes sintomas: busca compulsiva por álcool, perda de controle em relação ao consumo da droga, uso contínuo apesar das várias consequências negativas, aumento da tolerância à droga, quando são necessárias maiores doses de álcool para atingir o mesmo efeito obtido ou efeito cada vez menor com uma mesma dose da substância, estado de abstinência física, que apresenta sintomas como sudorese, tremores e ansiedade quando a pessoa está sem o álcool, o aparecimento de estados emocionais negativos, como a frustração, raiva, ansiedade, depressão ou o tédio, quando seu acesso é interrompido, e também o risco de recaída, mesmo após longos períodos de tempo sem o consumo dessa droga (NATIONAL INSTITUTE ON ALCOHOL AND ALCOHOLISM, 2013).

A quantidade e o padrão de consumo de álcool apresentam grande variação entre seus consumidores, dentro de um mesmo país e também entre diferentes países do mundo. Os níveis de consumo em um país são tipicamente apresentados como o volume de álcool puro consumido por adulto (pessoa acima de 15 anos), por ano. Dados publicados pela Organização Mundial da Saúde (OMS), que mostraram que os maiores níveis de consumo per capita são vistos em toda a Europa Oriental e Rússia e os níveis mais baixos em todos os países predominantemente islâmicos do Norte da África, Oriente Médio e Sudeste Asiático. Por exemplo, o consumo anual per capita é de 11,6 litros no Reino Unido, 12,2 litros na Austrália, 10,2 litros no Canadá e 9,2 litros no EUA. Essa mesma análise mostrou que no Brasil os níveis de consumo chegaram a 8,7 litros (GILMORE et al., 2016) (Figura 1).

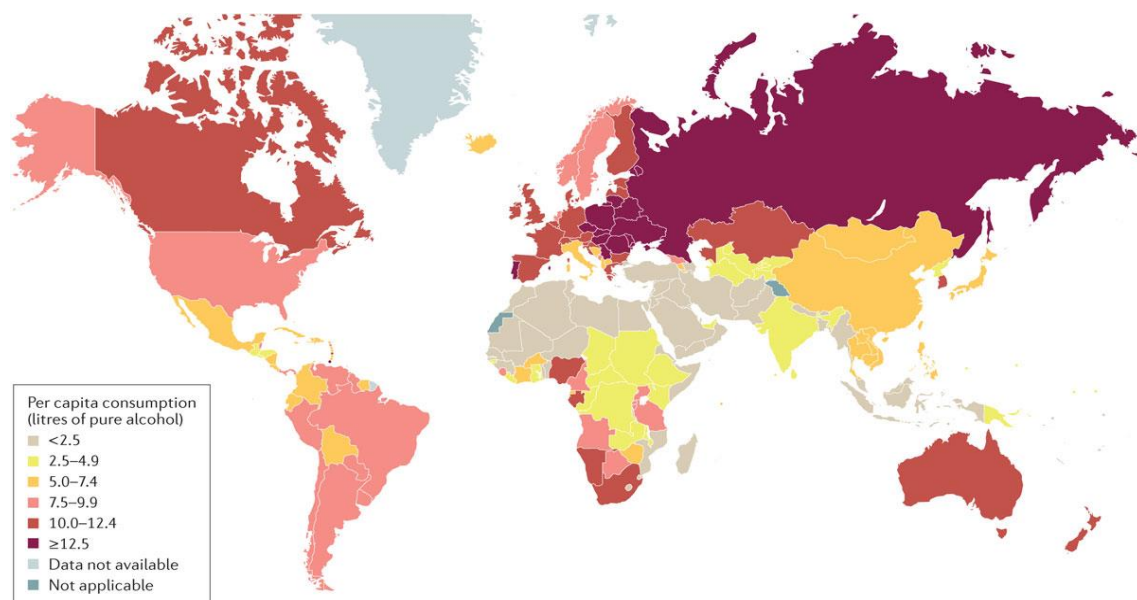


Figura 1 Consumo de álcool puro no mundo (em litros) por pessoa com mais 15 anos em 2010. Fonte: Gilmore, W. et al. 2016. Alcohol: taking a population perspective. Nature Reviews.

Acredita-se que cerca de 500 milhões de pessoas se encontram dentro dos critérios de dependência alcoólica em todo o mundo (COOK, 1998; KAPHALIA; CALHOUN, 2013). Nos Estados Unidos, 86,4% das pessoas com 18 anos ou mais reportaram já terem consumido álcool em algum momento da vida. Além disso, é estimado que cerca de 16 milhões de pessoas tenham transtorno associado ao uso de álcool (2015 National Survey

on Drug Use and Health - NSDUH). Em relação ao Brasil, dados do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Políticas Públicas do Álcool e Outras Drogas (INPAD) revelaram, em 2012, que 15,5% de indivíduos dentro da faixa etária de 18 a 24 anos são dependentes de álcool no Brasil (GALDURÓZ; CAETANO, 2004). Mais ainda, o alcoolismo se encontra intimamente correlacionado com a incidência de outras doenças, representado por 10% dos problemas totais de saúde no Brasil (BABOR, 2010; MELONI; LARANJEIRA, 2004).

O abuso de álcool causa grandes impactos na economia dos países devido as consequências negativas pelo alto consumo da droga. Nos Estados Unidos, por exemplo, esses custos chegaram a 249 bilhões de dólares em 2010. Além disso, o excesso do consumo de álcool também implica em uma mortalidade elevada em toda a população mundial. Nos últimos 20 anos, o alcoolismo passou de oitavo para quinto principal fator de risco para a mortalidade precoce e incapacidade na população mundial. As mortes atribuídas ao consumo de álcool chegaram a 88 mil por ano nos Estados Unidos e, em todo o mundo, essa mortalidade chega a ser 30 vezes maior que nos Estados Unidos, alcançando, então, 3,3 milhões de mortes (5,9% do total de mortes) em 2012, segundo a OMS (KARAVITIS et al., 2013). Em 2014 a OMS relatou que o álcool contribuiu para mais de 200 doenças e condições de saúde relacionadas ao consumo de álcool, como cirrose hepática, cânceres e outras lesões. Já em 2015, de 79 mil mortes em indivíduos com 12 anos ou mais, 47% delas tinham relação com álcool. O abuso de álcool é um grande problema entre pacientes hospitalizados. Alcoolistas estão predispostos a desenvolver doenças graves e aumento das taxas de complicações e mortalidade em comparação aos não-alcoolistas (MEHTA, 2016).

O tratamento para transtornos associados ao uso de álcool inclui várias abordagens. Além da ajuda e suporte de grupos como os alcoólicos anônimos e a ajuda profissional, o tratamento do alcoolismo pode incluir a prescrição de medicações, que tem como objetivo tornar mais fácil o processo de deixar de ingerir bebidas alcoólicas, o aconselhamento sobre álcool, terapia de conversa e programas especializados de tratamento intensivo (NATIONAL INSTITUTE ON ALCOHOL AND ALCOHOLISM, 2013).

1.1.2 O metabolismo do etanol

O etanol é uma molécula pequena, com absorção relativamente lenta pelo estômago e absorção mais rápida pelo intestino. Por ser solúvel em água, ele acessa rapidamente a corrente sanguínea, de onde é livremente distribuído para a maioria dos órgãos e sistemas. O coração, o cérebro e os músculos estão sujeitos às mesmas concentrações de álcool do sangue, com exceção do fígado, que fica sujeito a concentrações maiores, uma vez que recebe e metaboliza quase todo o etanol absorvido do estômago e do intestino. O fígado é um órgão particularmente susceptível aos danos provocados pelo consumo de álcool, pois ele é o principal sítio de metabolização desta substância no organismo. A grande maioria do álcool consumido é metabolizada por este órgão, mas cerca de 2 a 10% do álcool ingerido é também metabolizado e eliminado pelos rins e pulmões (KAPHALIA; CALHOUN, 2013).

O primeiro passo no metabolismo do álcool é a sua rápida oxidação à acetaldeído pela enzima denominada álcool desidrogenase (ADH). Esta enzima converte o álcool em acetaldeído que, mesmo em pequenas concentrações, é tóxico para o organismo. A enzima aldeído desidrogenase (ALDH), por sua vez, converte o acetaldeído em acetato. A maior parte do acetato produzido atinge outras partes do organismo pela corrente sanguínea onde participa de outros ciclos metabólicos. O álcool também pode ser metabolizado pelo citocromo microsomal P450 2E1 (CYP2E1) e pela via da catalase peroxissomal para acetaldeído, tanto no fígado quanto nos pulmões, conferindo mecanismo alternativo de metabolismo, que é particularmente induzido durante o abuso crônico de álcool e é responsável pela produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). (KAPHALIA; CALHOUN, 2013; KOOP, 2006; YEH et al., 2007). Através de cada uma destas vias, o etanol produz específicas perturbações metabólicas e tóxicas, e todas as três vias resultam na produção de acetaldeído, um metabólito altamente tóxico (LIEBER, 2005) (Figura 2).

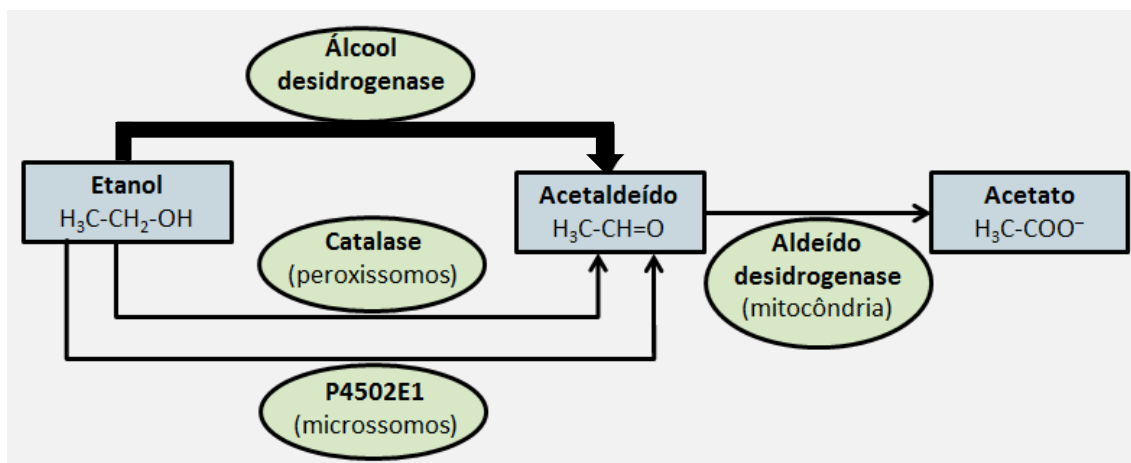


Figura 2. Vias de metabolismo do etanol. O álcool é metabolizado por três vias. A mais comum delas envolve as enzimas álcool desidrogenase (ADH) e aldeído desidrogenase (ALDH). Estas enzimas ajudam a quebrar a molécula de álcool, tornando-se possível eliminá-lo do organismo. Em primeiro lugar, ADH metaboliza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

Muitos dos efeitos metabólicos e tóxicos do álcool nos órgãos têm sido relacionados com o seu metabolismo oxidativo a acetaldeído, que gera um desequilíbrio no status redox local e à lesão tecidual. Entre os sistemas de órgãos, os pulmões de mamíferos são um potencial alvo do estresse oxidativo resultante do abuso crônico de álcool, pois além de metabolizá-lo, pode também sofrer por exposição direta a poluentes ambientais tóxicos, fumaça, e outras partículas presentes no ar (KAPHALIA; CALHOUN, 2013; YEH et al., 2007). O estresse oxidativo está associado à oxidação de proteínas, lipídeos e DNA que afetam a homeostase celular. Portanto, o estabelecimento de uma causa e efeito de inter-relação entre a toxicidade e estresse oxidativo poderia proporcionar uma melhor compreensão da indução da lesão pulmonar após o metabolismo de etanol por esse órgão (KAPHALIA; CALHOUN, 2013; KOOP, 2006).

1.1.3 A relação entre o consumo de álcool e as doenças inflamatórias e infecciosas

Indivíduos com transtorno por uso de álcool não estão apenas mais propensos a desenvolver dependência psicológica e física, mas também podem apresentar outros

problemas de saúde graves a longo prazo. Dentre eles, os mais comuns são a cirrose hepática, cardiomiopatia, neuropatia, demência, pancreatite, cânceres e outras lesões (BODE; BODE, 2005; NAGY, 2015).

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

Há muitos séculos, médicos têm observado que o consumo excessivo de álcool pode levar não apenas ao dano hepático, mas também está associado com aumento de morbidade e mortalidade por doenças infecciosas. O primeiro cirurgião geral dos Estados Unidos, Benjamin Rush, publicou um artigo intitulado “*An Inquiry Into the Effects of Ardent Spirits Upon the Human Body and Mind*”, em 1785, em que ele relatou que pacientes que abusavam de álcool eram vulneráveis a febre amarela, tuberculose, pneumonia e abscessos (LIEBER, 2005; MOLINA et al., 2010).

O abuso de álcool é um grande problema entre pacientes hospitalizados. Alcoolistas estão predispostos a desenvolver doenças graves e aumento nas taxas de complicações e mortalidade em comparação aos indivíduos não-alcoolistas. (MESSINGHAM; FAUNCE; KOVACS, 2002; SIMET; SISSON, 2015a). Dentre as diversas complicações geradas pelo alcoolismo, a modulação da regulação imunológica pode ser, de alguma forma, prejudicial à resposta imune do hospedeiro durante uma infecção (BODE; BODE, 2005; NAGY, 2015).

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

de alguma forma, prejudicial à resposta imune do hospedeiro durante uma infecção (COOK, 1998; SZABO et al., 2015).

Além disso, os pulmões também são afetados pelo abuso de álcool, um fato frequentemente negligenciado por clínicos e pela população. Pacientes com transtorno por uso de álcool são mais propensos a desenvolver pneumonias desencadeadas pelo vírus sincicial respiratório (VRS) (JERRELLS et al., 2007; SIMET; SISSON, 2015b), *Streptococcus pneumoniae* (LUONG et al., 2015; TREVEJO-NUNEZ et al., 2015), *Klebsiella pneumoniae* (CHIU et al., 2018) tuberculose (TRIPATHI et al., 2018), e SDR (LIANG; YELIGAR; BROWN, 2012). O que se tem observado, em geral, é uma maior susceptibilidade para essas infecções pulmonares, causada pelo impedimento da resposta imune em indivíduos que abusaram do consumo de álcool. As células imunes-chave envolvidas no processo de combate a essas infecções pulmonares são os neutrófilos, os macrófagos alveolares, os linfócitos, e outras células responsáveis pela imunidade inata, embora os mecanismos pelos quais o álcool afeta essas células e como esses efeitos contribuem para a fisiopatologia das doenças pulmonares em alcoolistas não são completamente conhecidos (COOK, 1998; MOLINA et al., 2010).

Os macrófagos alveolares comprometidos pelo consumo abusivo de etanol pode reduzir a produção de citocinas e quimiocinas inflamatórias em resposta à infecção pulmonar, resultando em uma elevada carga bacteriana e aumento da mortalidade (COOK, 1998; YELIGAR et al., 2012a). Estudos têm demonstrado o efeito do álcool na alteração do fenótipo de macrófagos alveolares. Ohama e colaboradores (2014) retrataram que em camundongos expostos cronicamente ao etanol há uma predominância de macrófagos alternativamente ativados - perfil M2 -, que são caracterizados pela produção de IL-10 e pela expressão de outras moléculas que impedem que o macrófago residente se converta em macrófago M1. Quando esses animais consumistas de álcool são infectados por *K. pneumoniae*, eles apresentam maior letalidade associada a uma maior carga bacteriana (OHAMA et al., 2014).

Já o trabalho realizado por Meyerholz e colaboradores (2008), demonstrou o efeito do consumo de etanol na resposta imune adaptativa mediada por linfócitos em um modelo de infecção pelo vírus influenza. Os camundongos que consumiram álcool cronicamente não conseguiram montar uma resposta específica mediada por células T CD8⁺ após infecção pelo vírus (MEYERHOLZ et al., 2008).

Devido à influência do etanol nas células do sistema imune, não é surpreendente que a exposição ao etanol também tenha grandes efeitos na produção de citocinas, que

são proteínas essenciais para orquestrar todo o processo inflamatório. Um aumento global de citocinas pró-inflamatórias derivadas de macrófagos, tais como IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- α têm sido relatados no soro de pacientes com DALs. Além disso, na ausência de DALs, a influência de etanol sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias nos indivíduos é menor (MANZO-AVALOS; SAAVEDRA-MOLINA, 2010). Um modelo de exposição aguda ao álcool de El-Guindy e colaboradores (2007), seguido de um estímulo com LPS, mostrou que o etanol reduziu significativamente a produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-6 e aumentou a produção basal de IL-10, uma citocina conhecidamente anti-inflamatória, sugerindo que a intoxicação com etanol diminui a resposta inflamatória aguda pela diminuição da produção de mediadores pró-inflamatórios importantes (EL-GUINDY; VILLIERS; DOHERTY, 2007).

Um estudo utilizando camundongos e em monócitos humanos mostrou o efeito do consumo crônico de etanol após infecção por *Mycobacterium tuberculosis*. Foi observado que, após a infecção, as células predominantes no pulmão de camundongos que consumiram álcool eram CD11b+Ly6G+. Essas células foram responsáveis por uma grande produção de IFN- α nos pulmões, o que induziu uma maior necroptose de macrófagos nos pulmões e conseqüentemente maior mortalidade dos animais que consumiram etanol, comparados com os animais controle, após infecção por *M. tuberculosis*. Já para os monócitos coletados de pacientes alcoolistas com infecção latente pelo *Mycobacterium tuberculosis* (ILTB), também foram observadas maiores produções de IFN- α quando comparado com pacientes não alcoolistas também com ILTB após estímulo por *M. tuberculosis* (TRIPATHI et al., 2018)

O consumo de álcool tem também o potencial de afetar os mediadores especializados pró-resolutivos (SPM). Um estudo *in vitro* com exposição aguda a etanol (25 ou 50 mM) mostrou que o álcool influencia a expressão gênica de genes relacionados a glicocorticoides. A presença de etanol ativa o receptor de glicocorticoide e regula positivamente, e de maneira dose dependente, a expressão de GILZ em uma linhagem de monócitos humanos, mostrando mais uma vez a influência do álcool na alteração de moléculas envolvidas na regulação da resposta inflamatória (BARDEN et al., 2018).

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

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

1.1.4 Modelos animais de consumo de etanol

Modelos animais são muito importantes para se avaliar as funções fisiológicas normais e anormais de processos complexos da fisiologia humana. O desenvolvimento de um modelo animal de alcoolismo tem sido particularmente difícil pelo fato de que os animais geralmente usados como modelos científicos (camundongos e ratos) não consomem álcool voluntariamente sob condições normais sem manipulações experimentais (BELL et al., 2006).

A habilidade de induzir adição em uma variedade de espécies de animais pode ser definida por várias características. Um modelo experimental de alcoolismo precisa atender a alguns critérios básicos, dentre eles: (i) o consumo de etanol deve ser feito pelo próprio animal; (ii) a quantidade de etanol consumido deve resultar em concentrações relevantes de etanol no sangue após a administração da droga; (iii) o etanol deve ser consumido por causa dos seus efeitos farmacológicos após ingestão, não pelo seu valor calórico, sabor ou cheiro; (iv) o consumo de etanol deve levar a expressão de tolerância metabólica e funcional e também à abstinência (LESTER; FREED, 1973)

Vários modelos experimentais foram criados para superar a tendência natural dos roedores de limitar seu consumo de etanol. Os modelos mais recentes e amplamente utilizados incluem modelos envolvendo a criação seletiva para preferência por álcool; o acesso agendado ao etanol; períodos programados de privação de álcool e a ingestão forçada da droga (BECKER; RON, 2014).

A existência de vários modelos de consumo de etanol se deve ao fato de que os padrões de uso da droga pelos seres humanos também sofrem grande variação (NELSON; KOLLS, 2002). Por exemplo, o padrão de consumo chamado beber episódico pesado, ou beber em *binge* envolve a tomada de uma quantidade específica de álcool durante um curto período de tempo, ou seja, é uma ingestão aguda de etanol. Desta forma, para homens seriam ≥ 5 *drinks* e para mulheres ≥ 4 , sendo que a concentração de álcool no sangue desses indivíduos seria de 0,08 % (FLOWERS et al., 2008). Já o padrão de

consumo pesado é caracterizado por beber mais de dois drinks por dia para homens e um para mulheres por um tempo prologado (ingestão crônica) (FLOWERS *et al.*, 2008).

Embora o uso leve e moderado e em *binge* de álcool pode causar efeitos negativos no sistema imune, é o consumo crônico que tem sido associado com as alterações mais relevantes no sistema imune que predispõe o indivíduo a infecções (COOK, 1998; SZABO *et al.*, 2015). E é este padrão de consumo mostrado na maioria dos trabalhos como o fator responsável pela maior susceptibilidade de pacientes e animais a infecções, pulmonares ou não.

Considerando os fatores apresentados até aqui, os estudos da literatura indicam que as alterações mais significativas causadas pelo consumo excessivo de etanol na resposta imune são associadas ao consumo crônico. Dessa forma, no presente estudo, optou-se pelo uso do modelo de consumo crônico de etanol seguido de um modelo de infecção aguda pelo fungo *Aspergillus fumigatus*, um patógeno pulmonar com grande relevância médica. Embora haja grande evidência científica sobre a relação entre o consumo crônico de etanol e uma maior incidência de infecções pulmonares, os dados sobre infecção em alcoolistas com fungos, são escassos. A primeira vez que foi reportado um caso clínico de um paciente alcoolista que contraiu aspergilose invasiva aconteceu em 1978. Esse paciente não apresentava nenhuma outra doença debilitante e também não passou por nenhum tratamento de imunossupressão, como tratamento com esteroides ou outros antibióticos (BLUM *et al.*, 1978). Mais recentemente, outro trabalho demonstrou a incidência de aspergilose invasiva em pacientes com hepatite alcoólica, mas a aspergilose surgiu como uma complicação do tratamento para a hepatite, que consistiu no uso de corticosteroides (GUSTOT *et al.*, 2014). Além disso, nos trabalhos publicados, há também uma carência de mecanismos relacionados ao efeito do consumo de etanol nessa infecção.

1.2 *Aspergillus* e aspergilose

1.2.1 O microrganismo *Aspergillus fumigatus*

O gênero *Aspergillus* compreende um grupo de fungos ubíquos e saprofíticos que desempenham um importante papel na reciclagem ambiental de carbono e nitrogênio. Seu nicho ecológico principal é o solo ou vegetação em decomposição, porém, o *Aspergillus*

produz pequenos conídios que se dispersam facilmente pelo ar, podendo sobreviver em nas mais diversas condições ambientais. O gênero *Aspergillus* inclui cerca de 200 espécies, sendo algumas consideradas importantes patógenos em humanos. As doenças fúngicas podem ir desde infecções superficiais de pele até infecções invasivas a órgãos internos, sendo as infecções superficiais mais comuns e mais fáceis de curar. Já as invasivas são menos frequentes, porém oferecem risco de vida. Dentre as espécies patogênicas desse gênero, o *Aspergillus fumigatus* é o agente etiológico de cerca de 90% das infecções diagnosticadas (DAGENAIS; KELLER, 2009; LATGÉ; CHAMILOS, 2020).

A. fumigatus é considerado uma das espécies mais comuns que habita a microbiota fúngica transportada pelo ar (TEKAIA; LATGÉ, 2005). Possui uma alta capacidade de esporulação, já que cada conidióforo produz milhares de conídios. Os conídios liberados na atmosfera são de diâmetro pequeno, cerca de 2,5 µm de diâmetro. Não há um mecanismo elaborado para liberação de conídios, a disseminação se dá simplesmente por perturbações do ambiente e forte corrente de ar. Uma vez que os conídios estão no ar, o seu pequeno tamanho os torna flutuantes e tende a mantê-los no ar, tanto em ambientes internos quanto em espaços abertos. Estudos ambientais indicam que todos os seres humanos inalam, pelo menos, centenas de conídios de *A. fumigatus* por dia (DAGENAIS; KELLER, 2009; PEREZ-NADALES et al., 2014). Considerando a sua capacidade em sobreviver em diferentes condições ambientais e dispersão eficaz no ar, e por possuir características físicas que permitem que os conídios atinjam as vias respiratórias distais, e consequente adaptação rápida no meio ambiente hospedeiro, o *A. fumigatus* é um importante patógeno pulmonar em humanos (Figura 3) (KWON-CHUNG; SUGUI, 2013; LATGÉ; CHAMILOS, 2020).

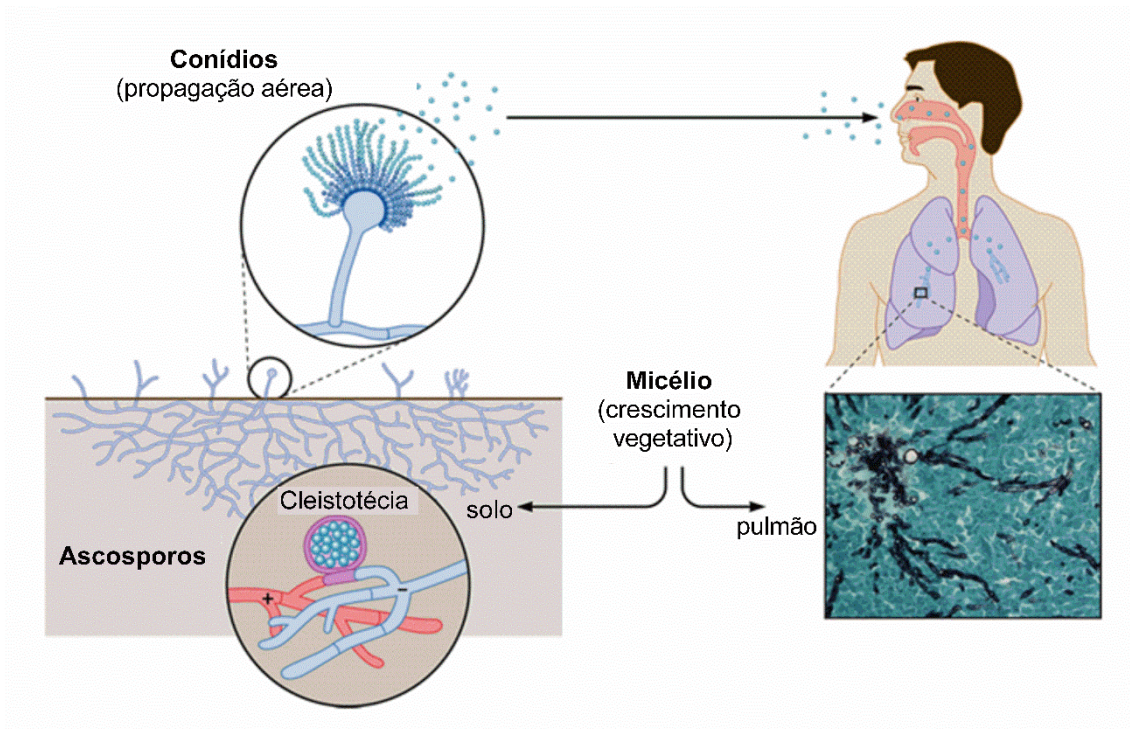


Figura 3. A capacidade de adaptação a diversas condições ambientais de *A. fumigatus* permite que ele cresça tanto no solo quanto no tecido pulmonar. Adaptado de: Latgé J-P, Chamilos G. 2019. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis in 2019. *Clin Microbiol Rev* 33:e00140-18. <https://doi.org/10.1128/CMR.00140-18>.

1.2.2 Aspergilose pulmonar

A aspergilose pulmonar é uma infecção de prognóstico reservado, que ocorre principalmente em indivíduos imunocomprometidos e acontece em qualquer parte do mundo. As taxas de mortalidade variam de 50% a 95% em populações de alto risco e são dependentes de fatores como o estado imunológico do hospedeiro, o local da infecção, e o regime de tratamento aplicado (BALLOY; CHIGNARD, 2009; LATGÉ; CHAMILOS, 2020; MARGALIT; KAVANAGH, 2015). São conhecidas três formas da doença: a aspergilose saprofítica, caracterizada pela colonização das vias aéreas ou pela formação do aspergiloma; a aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA), na qual há a indução de uma resposta imune desencadeada pela secreção de toxinas e alérgenos pelo fungo em desenvolvimento. A terceira forma é a aspergilose pulmonar invasiva (API), ou aspergilose invasiva (AI), que tem como características a proliferação e crescimento das hifas invasivas dentro do tecido pulmonar (LATGÉ; CHAMILOS, 2020).

A infecção por *A. fumigatus* se inicia após a inalação de conídios presentes no ar, seguida pela deposição nos bronquíolos ou nos alvéolos pulmonares. Nos indivíduos imunocompetentes, as barreiras físicas e a imunidade inata são de grande importância para a defesa do hospedeiro. As células epiteliais do trato respiratório superior contribuem para a eliminação de microrganismos e partículas exógenas, a partir da secreção de muco e pelo transporte ativo mediado por cílios. Nos alvéolos, os pneumócitos são responsáveis pela secreção do surfactante pulmonar, com atividade antimicrobiana. No entanto, em pacientes imunocomprometidos os conídios podem escapar dessas defesas (BRUNE et al., 2015; LATGÉ; CHAMILOS, 2020; PEREZ-NADALES et al., 2014).

Após deposição nos espaços alveolares, os conídios, que até então estavam em estado de repouso, se tornam metabolicamente ativos. Concomitantemente, há a perda da camada *rodlet*, uma camada de hidrofobinas que recobrem a parede celular fúngica. Nesse contexto, há a exposição de componentes pertencentes à parede celular do fungo, o que culmina no desencadeamento da resposta imune pró-inflamatória no hospedeiro (DAGENAIS; KELLER, 2009; LATGÉ; CHAMILOS, 2020). A resposta inflamatória está relacionada com o reconhecimento dos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) do fungo, por intermédio dos receptores de reconhecimento de padrão (PRRs), presentes nos macrófagos alveolares e células epiteliais do hospedeiro. Os conídios e as hifas são capazes de ativar macrófagos pelos receptores TLR2 e TLR4, enquanto dectina-1 reconhece o carboidrato fúngico $\beta(1,3)$ -glucana, que está normalmente mascarado na

parede celular dos conídios do fungo. Com a perda da camada *rodlet*, há a germinação dos conídios e seus PAMPs são reconhecidos (CHAI et al., 2011; ERWIG; GOW, 2016).

A sinalização desencadeada por dectina-1 ativa a via do fator nuclear κ B (NF- κ B) e induz a expressão de citocinas e quimiocinas, que são importantes para a defesa do hospedeiro contra este organismo e também para o recrutamento de neutrófilos, incluindo TNF- α , IL-8, IL-6, IL-1 α , IL-1 β , fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF), fator estimulador de colônias granulócitos e macrófagos (GM-CSF), as quimiocinas CCL-3 e CCL-4, os ligantes de CXCR2, as quimiocinas CXCL1 e CXCL2 e a citocina anti-inflamatória IL-10, indicando que há também um controle da resposta inflamatória (CHAI et al., 2011; ERWIG; GOW, 2016; VALIANTE et al., 2015).

O papel principal de eliminação desse patógeno cabe aos macrófagos alveolares e aos neutrófilos e a atividade antimicrobiana relacionada a essas células (LATGÉ; CHAMILOS, 2020). Os neutrófilos têm a capacidade de fagocitar tanto conídios quanto tubos germinativos e são considerados as principais células de defesa contra as hifas. Portanto, um dos pontos substanciais desta infecção fúngica, é que indivíduos neutropênicos, devido a tratamentos imunossupressores, estão especialmente mais propensos a infecções por *A. fumigatus* (LATGÉ; CHAMILOS, 2020; PEREZ-NADALES et al., 2014).

A exposição aos conídios de *A. fumigatus* pode também desencadear respostas mediadas por linfócitos T CD4+. Isto inclui as células T auxiliares (Th1, Th2 e Th17). Vários fatores contribuem para a diferenciação de linfócitos T CD4+ por *A. fumigatus*, incluindo a frequência de exposição e o tipo de antígeno (THAKUR et al., 2015).

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

2 JUSTIFICATIVA

O alcoolismo é uma doença grave e um grande problema de saúde pública, já que o efeito do consumo de etanol é bastante prejudicial a vários órgãos, como fígado, pulmões, coração, estômago, intestinos e cérebro. Ademais, o consumo abusivo de álcool tem sido correlacionado com alterações funcionais no sistema imunológico, o que pode induzir o comprometimento de uma resposta imune. Várias observações clínicas e modelos de infecção mostraram que o consumo de álcool é associado a uma maior susceptibilidade a doenças inflamatórias, como as infecções pulmonares causadas por vírus, bactérias e fungos, representando uma séria causa de morbidade e mortalidade nesta condição. Além disso, estudos têm mostrado que o metabolismo das células imunes sofre grande influência do meio externo, o que pode influenciar a expressão proteica e modular uma resposta inflamatória. Considerando que a exposição prolongada ao álcool pode modular a expressão de mediadores pró-inflamatórios e pró-resolutivos em diversas infecções pulmonares e também pode afetar o trato gastrointestinal, faz-se necessário caracterizar estes eventos e entender, mais profundamente, os mecanismos pelos quais o álcool causa esses efeitos. Diante disso, esse estudo visa compreender como acontecem as interações patógeno-hospedeiro que regem a instalação e desenvolvimento de uma infecção pulmonar fúngica em um hospedeiro consumista crônico de etanol. Além disto, buscar os mecanismos envolvidos na maior susceptibilidade ao hospedeiro às infecções, já que elucidar os mecanismos envolvidos nestas interações pode contribuir para futuras intervenções terapêuticas no controle do processo inflamatório, proveniente de uma infecção, em um hospedeiro alcoolista.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar os efeitos do consumo crônico de etanol na resposta inflamatória durante a infecção pulmonar por *Aspergillus fumigatus*, bem como mecanismos intracelulares relacionados e efeitos na composição bacteriana intestinal.

3.2 Objetivos específicos

Capítulo 1. Caracterização da resposta inflamatória durante infecção pulmonar por *Aspergillus fumigatus*

- Caracterizar o curso da infecção por *A. fumigatus* em modelo animal imunocompetente;
- Avaliar quais as principais células e mediadores inflamatórios envolvidos na fase inflamatória e retorno à homeostase tecidual após infecção por *A. fumigatus*;

Capítulo 2. O efeito do consumo de etanol durante infecção pulmonar por *Aspergillus fumigatus*

- Avaliar o efeito do consumo crônico de etanol na susceptibilidade e depuração fúngica de *A. fumigatus*;
- Caracterizar o efeito do consumo crônico de álcool no recrutamento de neutrófilos para o sítio da infecção por *A. fumigatus*;
- Avaliar o efeito do consumo crônico de álcool nos mecanismos de ativação e nas funções efetoras dos neutrófilos;

Capítulo 3. O efeito do consumo crônico na resolução da resposta inflamatória durante infecção pulmonar por *Aspergillus fumigatus*

- Investigar o efeito do consumo de álcool na resolução da resposta inflamatória durante infecção por *A. fumigatus*;
- Investigar o efeito do consumo de álcool na cinética de liberação de mediadores pró-inflamatórios e pró-resolutivos durante o curso da infecção por *A. fumigatus*;

Capítulo 4. Mecanismos celulares relacionados a deficiência de migração neutrofílica após exposição ao etanol



- Padronizar um modelo *in vitro* de exposição de neutrófilos ao etanol;
- Avaliar a capacidade fagocítica de neutrófilos expostos *in vitro* ao etanol;
- Investigar, *in vitro*, a quimiotaxia de neutrófilos expostos ao etanol;
- Avaliar, *in vitro*, a expressão de proteínas relacionadas a migração de neutrófilos após a exposição ao etanol;
- Investigar se a exposição de neutrófilos ao etanol, *in vitro*, afeta vias de metabolismo celular e consequentemente, as funções destas células;

Capítulo 5. O efeito do consumo crônico de etanol na composição bacteriana da microbiota intestinal

- Avaliar se o etanol induz à perda de diversidade bacteriana no TGI dos camundongos, ocasionada pelo tratamento crônico com etanol.

**4 CAPÍTULO 1 – CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA
CONTRA *Aspergillus fumigatus* (artigo)**

Acute lung injury and repair induced by single exposure of *Aspergillus fumigatus* in immunocompetent mice

Nathália LSO Malacco¹, Jéssica AM Souza¹, Aline C Mendes¹, Milene A Rachid², Lucas R Kraemer³, Matheus S Mattos³, Grazielle N Lima⁴, Lirlândia P Sousa⁴, Daniele G Souza⁵, Vanessa Pinho¹, Mauro M Teixeira¹, Remo C Russo³  & Frederico M Soriani*¹ 

¹Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

²Laboratório de Patologia Celular e Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

³Laboratório de Imunologia e Mecânica Pulmonar, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

⁴Laboratório de Sinalização da Inflamação, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

⁵Laboratório de Interação Microrganismo Hospedeiro, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

*Author for correspondence: Tel.: +55 313 409 3009; fredsori@icb.ufmg.br

Aim: Characterize the course of acute *Aspergillus fumigatus* lung infection in immunocompetent mice, investigating the immunological, pathological and tissue functional modifications. **Materials & methods:** C57BL/6 mice were intranasally infected with *A. fumigatus* conidia and euthanized to access inflammatory parameters. **Results:** Mice infected with *A. fumigatus* showed an inoculum-dependent lethality and body weight loss. An intense proinflammatory cytokine release, neutrophil infiltrate and pulmonary dysfunction was also observed in the early phase of infection. In the late phase of infection, proresolving mediators release, apoptosis and efferocytosis increased and lung tissue architecture is restored. **Conclusion:** Our study characterized an immunocompetent model of acute pulmonary *Aspergillus* infection in mice and opened an array of possibilities for investigations on interactions of *A. fumigatus* with host-immune system.

First draft submitted: 10 July 2019; Accepted for publication: 3 December 2019; Published online: 8 January 2020

Keywords: *Aspergillus* infection • acute lung injury • fungal infection • lung inflammatory response • pneumonia • pulmonary mechanics in fungal disease

Pneumonia is a great cause of deaths worldwide [1,2], involving lung parenchyma disruption by an intense tissue inflammation due to viruses, bacteria and fungi infections [3]. During infection, several changes in microcirculation such as angiogenesis, release of soluble molecules and polymorphonuclear (PMN) cells accumulation, that are quickly recruited from the lung capillaries to alveoli, followed by macrophages infiltration [4,5]. This process is critical for tissue homeostasis. Overwhelmed inflammation becomes deleterious to hosts, progressing to chronic events such as scarring and fibrosis [3] and complications, necrosis, abscess and emphysema [6].

Among several respiratory pathogens, fungi are responsible for nosocomial and community acquired pneumonias [7,8]. One of the most important opportunistic fungal pulmonary pathogen is *Aspergillus sp* [9,10] and *Aspergillus fumigatus* is responsible for almost 90% of all invasive aspergillosis diagnosed. *A. fumigatus* liberates airborne conidia which are inhaled by humans frequently [10,11] that once inhaled, triggers proinflammatory immune response [12]. For immunocompetent individuals, inhaled conidia are swiftly cleared by cells of the pulmonary immune system [9–11,13]. Whether innate immune system are not capable of eliminating conidia, they can germinate and form invasive hyphae, which might penetrate in lung tissue [12]. When the immune system is immunocompromised, *A. fumigatus* exploits fragility in host defenses which can result in aspergillosis [9,12].

Conidial recognition is essential to pathogen clearance. Other lines of defense include anatomical barriers on respiratory tract, such as mucociliary escalator, phagocytic cells, macrophages and neutrophils – and their related antimicrobial activity – and humoral factors, for example, complement [10]. After recognition by epithelial cells and alveolar macrophages, the functional innate immune response is pivotal against *A. fumigatus* [14]. It accounts with specific phases and host components that are recruited to confront the different cellular forms of the fungus [12]. Alveolar macrophages act rapidly in conidia phagocytosis and concomitantly secrete proinflammatory mediators that recruit neutrophils to the alveoli [8,9,12]. Neutrophils have an essential role in fungal clearance and, unlike macrophages, are able to eliminate germinating conidia, preventing hyphae growing [13]. In later stages of respiratory fungal infection, dendritic cells activate a protective *A. fumigatus*-specific adaptive immune response, which is driven by mixed Th1/Th2/Th17 [15].

Because of the possibility to examine complex biological processes, animal models are useful to help understand the physiopathology of pulmonary infections [16]. There is no single animal model that could address all questions in relation to *Aspergillus* infections, and each one has its own advantages and limitations [17–19]. Considering that immune response against fungal pathogens are diverse, precise understanding of the underlying inflammatory response is critical to allow adequate interventions [20]. Although neutrophil and monocyte/macrophage recruitment after *A. fumigatus* infection have been demonstrated [14,21,22], we now establish a self-resolutive model that correlates kinetics of the infection with inflammatory parameters, respiratory capabilities and inflammation resolution. The aim of our study is to establish an immunocompetent model that link cellular recruitment with other inflammatory parameters (i.e., cytokine and chemokine release) and correlate it to resolution of inflammation and pulmonary dysfunction.

Here, we investigate the progression of immunological, pathological and physiological events in a model of immunocompetent *A. fumigatus* pulmonary infection in mice. We show that there is a massive inflammatory process, characterized by an elevated number of neutrophils and inflammatory mediators in the acute phase of the single infection. Moreover, we observed the inflammatory infiltrate in pulmonary tissue that started after 1 day of infection and reaches a peak after 3 days post infection, with an elevated loss of respiratory capacity in early time points of the infection. The resolution phase of the *A. fumigatus* infection is characterized by release of proresolving cytokines, enhanced macrophage influx and clearance of apoptotic neutrophils from mice-infected airways, culminating with restoration of immunological and histological parameters. We expect elucidate mechanisms of host and fungal pathogen interactions and provide an exciting knowledge for discovering novel therapeutic targets, early diagnostic and drugs against these airborne human disease.

Materials & methods

Ethics statement

The animal ethics committee of Centro de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA/UFMG) approved all animal experiments, protocol number 62/2011, according to Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), the Brazilian national guidelines on animal work.

Fungal culture & animal infection

The strain used in this study was A1163 of *A. fumigatus* [23]. Media used was complete media, composed of 2% w/v glucose, 2% w/v agar, 0.5% w/v yeast extract and trace elements (YAG) [24]. *A. fumigatus* was grown at 37°C for 48 h. Conidia suspension was produced by harvesting micelia with 30 ml of sterile phosphate-buffered saline (PBS). Hypha fragments were removed by filtration in nylon membrane and cells counted in Neubauer chamber. For mice infection, all the procedures were done under pathogen free conditions at *Laboratório de Imunofarmacologia UFMG*. 10- to 12-weeks-old male C57BL/6J mice were anesthetized with 3% isoflurane/oxygen steaming mixture and then intranasally infected with 1×10^8 (or 3×10^8 in lethality experiments) conidia of *A. fumigatus* in a total volume of 40 μ l of sterile PBS. Infected mice (at least five mice per group) were euthanized at days 1, 3, 5, 7 (and 14 for pulmonary fibrosis assay) after infection.

Bronchoalveolar lavage fluid, cellular counting & tissue extraction

After the choice of time points post infection, mice were euthanized with anesthetic solution of 180 mg/kg of ketamine and 24 mg/kg of xylazine. Once death was confirmed, a 1.7 mm catheter was inserted into the trachea and lungs were washed twice with 1 ml of cold sterile PBS and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was performed. Recovery of BALF was approximately 90% per mouse. The samples were centrifuged at 1700 r.p.m. for 10 min at

4°C and supernatants were frozen at -20°C. The cell pellets were resuspended in PBS, and total cell counts were determined by counting leukocytes in Neubauer chamber to evaluate the number of infiltrating leukocytes into alveolar space. Differential cell counts were obtained from cytospin preparations (Shandon III) by evaluating the percentage of each leukocyte on a slide stained with May-Grunwald-Giemsa. Cells (at least 300 cells per animal) were counted at a magnification of 100×. Pulmonary tissue was extracted after perfusion of 5 ml of cold sterile PBS in order to remove circulating blood. Both lobes were removed and frozen for subsequent analysis.

Quantification of neutrophil, macrophage & eosinophil & hydroxyproline accumulation in lung tissue

The extent of neutrophil, macrophage and eosinophil accumulation in lung tissue was measured by assaying myeloperoxidase (MPO), N-acetylglucosaminidase and eosinophil peroxidase activity, respectively, as previously described [23]. Fragments of 100 mg of lungs were removed for hydroxyproline (HO-proline) determination, as an indirect measurement of collagen content [24].

Fungal burden

For lung fungal burden analysis, the right lungs were collected at specific time points after *A. fumigatus* exposure and homogenized in 1 ml of PBS, serially diluted and plated in YAG media. After incubation for 20 h at 37°C, colony-forming units (CFU) were counted.

Histological analysis

For histopathological analysis, left lobes of lungs were fixed in formalin and dehydrated gradually in ethanol. Paraffin embedded tissues were cut into 4-mm sections. Samples were stained with Hematoxylin and Eosin (HE) or Grocott's methenamine silver (GMS). HE stained slides were examined under light microscopy by a pathologist blind to the experimental procedure and severity and distribution of inflammatory damage was graded from zero to five according to previously described [25].

Measurement of inflammatory mediators, nitrite & total protein

The concentration of the cytokines TNF- α , IL-1 β , IL-17, IL-4, IL-10 and TGF- β (active and total forms) and chemokines CXCL1 and CCL2 were measured in BALF supernatants by ELISA. The assays were performed using DuoSet kits from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) and according to the manufacturer's instructions. Total protein quantification based on Bradford's method (Bio-Rad Protein Assay) was performed on BALF to measure protein leakage to airways [26]. The measurement of nitrite (NO₂⁻) in BALF was performed by Griess reaction [27].

Respiratory mechanics

Respiratory mechanics assessment was performed as previously described [28]. Briefly, anesthetized mice (130 mg/kg ketamine and 8.5 mg/kg xylazine) were tracheostomized and connected in a computer-controlled ventilator (Forced Pulmonary Maneuver System, Buxco Research Systems, NC, USA), in a body plethysmograph. Under mechanical respiration, Resistance and Compliance RC test were used to determine dynamic compliance (C_{dyn}) and lung resistance. The quasi-static pressure-volume maneuver was performed to measure the forced vital capacity (FVC) and inspiratory capacity. Forced expiratory volume (FEV) was also recorded. All the respiratory mechanic measurements were done at least three independent times.

Assessment of leukocyte apoptosis, efferocytosis & resolution parameters

At specified time points, BALFs were harvested and cytospin preparations were done. We determined the proportion of cells with distinctive apoptotic morphology and efferocytosis from BALF cytospin-prepared slides, by counting at least 500 cells/glass slides with apoptotic morphology or efferocytosed. Neutrophils apoptotic features considered were morphological changes in nuclei, such as chromatin condensation, nuclear fragmentation and apoptotic bodies arrangement out or inside macrophages and efferocytosis was determined by the percentage of macrophages that phagocytosed apoptotic cells as previously described [29]. Calculation of resolution parameters was also done in BALFs collected at 24, 72, 120 and 168 h of fungal infection. PMN and mononuclear cells were calculated by leukocyte counting. Then, the resolution of acute inflammation was determined by the indexes: Ψ_{max} and T_{max} , (magnitude), where Ψ_{max} is the maximal PMN and T_{max} is the time point when PMN numbers reach its

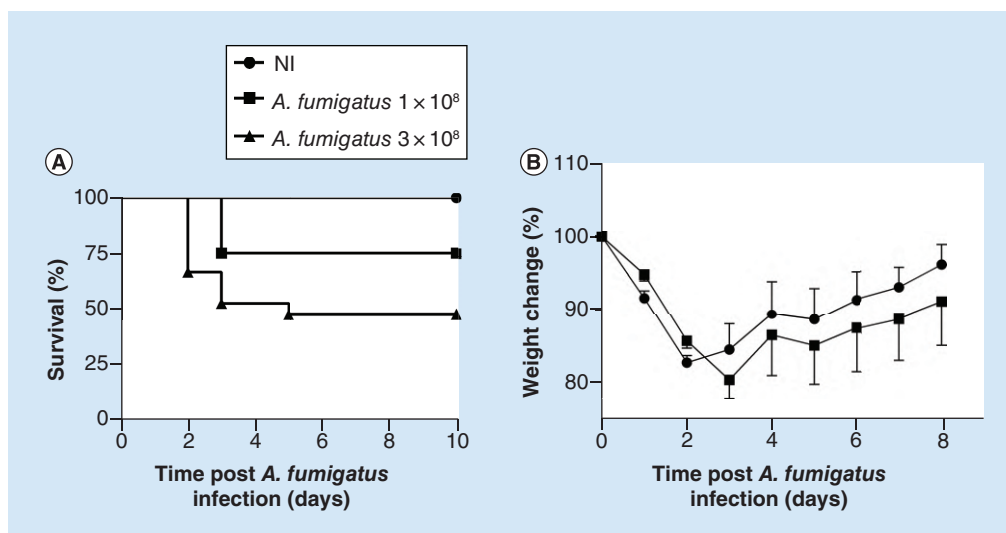


Figure 1. *Aspergillus fumigatus* infection cause an intense pulmonary inflammatory response in an inoculum-dependent manner. Mice were intranasally infected with 1×10^8 or 3×10^8 conidia of *A. fumigatus* and monitored for 10 days. Comparative lethality (A) and body weight change (B) curves of control noninfected group and infected groups. Body weight change data were analyzed in the group infected with 1×10^8 conidia of *A. fumigatus*. Data are presented as mean \pm standard deviation.

*Represents statistically significant difference ($p < 0.05$) between 1×10^8 infected group and noninfected control. Experiments were done at least three times (noninfected group: $n = 7$; infected groups: $n = 10$).

maximum; T50 (duration), that means the time point when PMN numbers diminish to 50% of maximum and Ri, the value between intervals Tmax and T50 and when 50% of PMNs are lost from the alveoli [29].

Statistical analysis

All experiments were done two- or three-times. Data were presented as the mean \pm standard deviation using Graph Pad Prism 6 software. Statistic test used was One-way analysis of variance and Tukey's post-test was used. Comparisons of two groups were done by unpaired *t* test. Long Rank test was used to survival analysis. Data were considered statistically different when $p < 0.05$.

Results

Susceptibility & body weight change after *Aspergillus fumigatus* infection in immunocompetent mice

To investigate the impact of *A. fumigatus* infection in immunocompetent C57BL/6 mice, lethality and body weight were analyzed as clinical parameters of disease progression after infection. We observed that the outcome of *A. fumigatus* infection is inoculum dependent. Mice infected with 1×10^8 conidia has lower lethality (25%) in comparison with 3×10^8 conidia mice infected (52.4%), at day 10 after infection (Figure 1A). Moreover, body weight after *A. fumigatus* infection had a significant decrease from 3 to 6 days post infection in both 1×10^8 and 3×10^8 infected group. However, mice that intranasally received 3×10^8 *A. fumigatus* conidia undergo even more marked weight loss compared with 1×10^8 inoculum group (Figure 1B). Thereafter, mice gradually regained their body weight. These results demonstrate that lethality and body weight loss induced by *A. fumigatus* infection are inoculum dependent.

Fungal clearance in immunocompetent mice

In order to further understand the influence of the fungal burden in mortality and loss of body weight, we determined mice ability to clear *A. fumigatus* from the lungs. During the coming analysis, we chose the less lethal inoculum to evaluate fungal clearance and all histological, cellular inflammatory and physiological parameters. We performed GMS staining of lung tissues and also the number of conidia of *A. fumigatus*, CFU in lung homogenates at 1 and 3 days post infection, period in which the inflammatory response is more acute, regardless to the inoculum. In comparison with the noninfected group (Figure 2A), GMS staining revealed a wide presence of conidia at 1

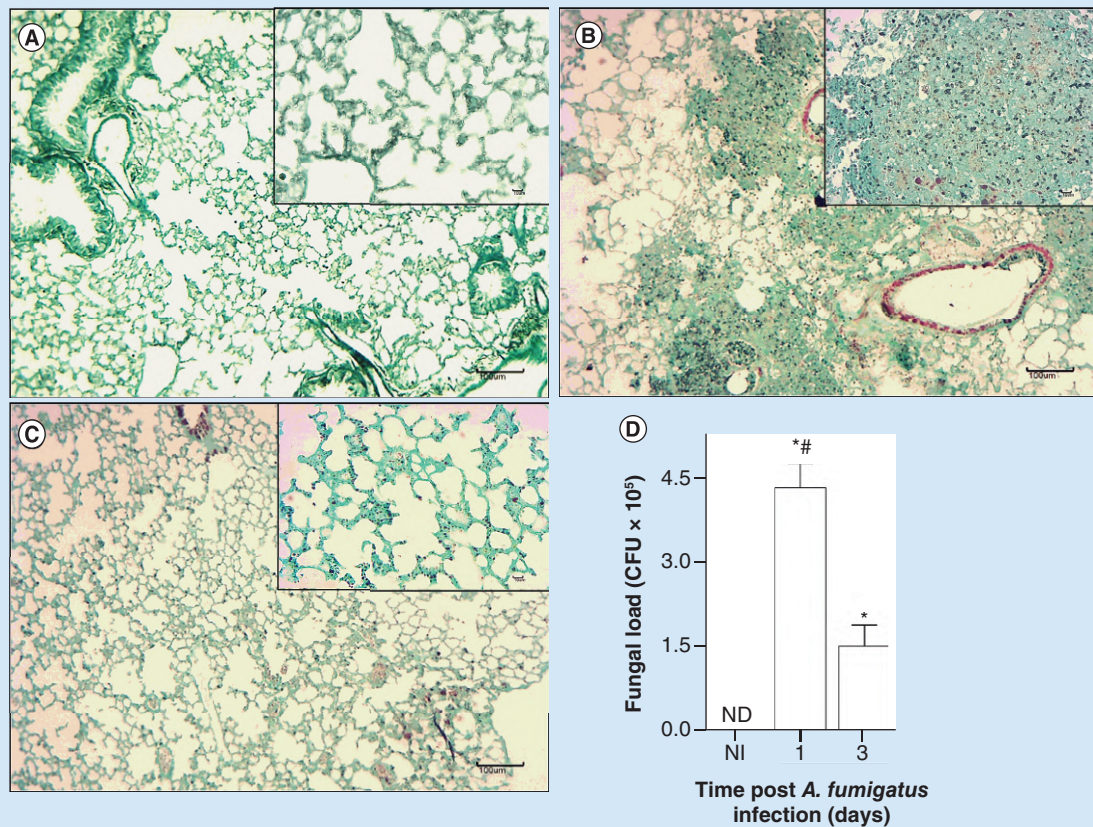


Figure 2. Clearance of *Aspergillus fumigatus* from the airways. Mice were infected via intranasal with 1×10^8 conidia of *A. fumigatus*. Lungs were harvested 1 and 3 days after the infection. Homogenate from right lungs were plated on YG-agar. Left lungs were fixed with formaldehyde 4% (w/v) and embedded in paraffin. Sections were stained with Grocott's methenamine silver. (A) Noninfected (B) 1 day of infection (C) 3 days of infection and (D) fungal load (CFU) after 1 and 3 days of infection. Experiments were done at least three times. Data are presented as mean \pm standard deviation (n = five to seven mice per group). *Statistically significant difference ($p < 0.05$) against noninfected control; #statistically significant against the 3 days of infection group. Bars in bigger pictures represent 100 μ m, while bars in inserts represent 10 μ m. CFU: Colony-forming unit.

day post infection (Figure 2B), followed by a reduction of this fungal load at 3 days after *A. fumigatus* inoculation (Figure 2C). Pulmonary fungal counts revealed that fungal load is raised at 1 day post *A. fumigatus* inoculation, and there is a reduction of this burden at 3 days post infection (Figure 2D). Taken together, these results indicate that the host immune system is capable to clear the infection in a proper manner at the initial phases of infection.

Kinetics of cellular influx into airways after *A. fumigatus* infection

To characterize inflammatory cell infiltration into the lungs and airways, we evaluated the kinetics of leukocyte accumulation and number of different leukocytes present in the alveolar space and lung tissue at various time points after *A. fumigatus* infection. Overall, after 1 day of infection, there is a massive recruitment of inflammatory cells to the site of infection, that reaches a peak at 3 days of infection and significantly decrease at 5 and 7 days of infection, compared with noninfected mice (Figure 3A). Neutrophils represented the great majority of the infiltrated cells in early times of infection. These cells reached a peak at day 3 after infection and then reduced drastically in the late phase of infection when possibly the resolution of infection takes place and neutrophils return to basal levels (Figure 3B). On the other hand, macrophages influx increases considerably in the airways in the third day post *A. fumigatus* infection and its levels remain high until day 7. (Figure 3C). Moreover, there is also an accumulation of lymphocytes and eosinophils into the airways of infected mice after 3 days of infection (Figure 3D & E). MPO analysis showed that after 1 day of infection neutrophils accumulate substantially in lung tissue and decrease gradually until day 7 post infection (Figure 3F). N-acetylglucosaminidase level indicates that macrophages

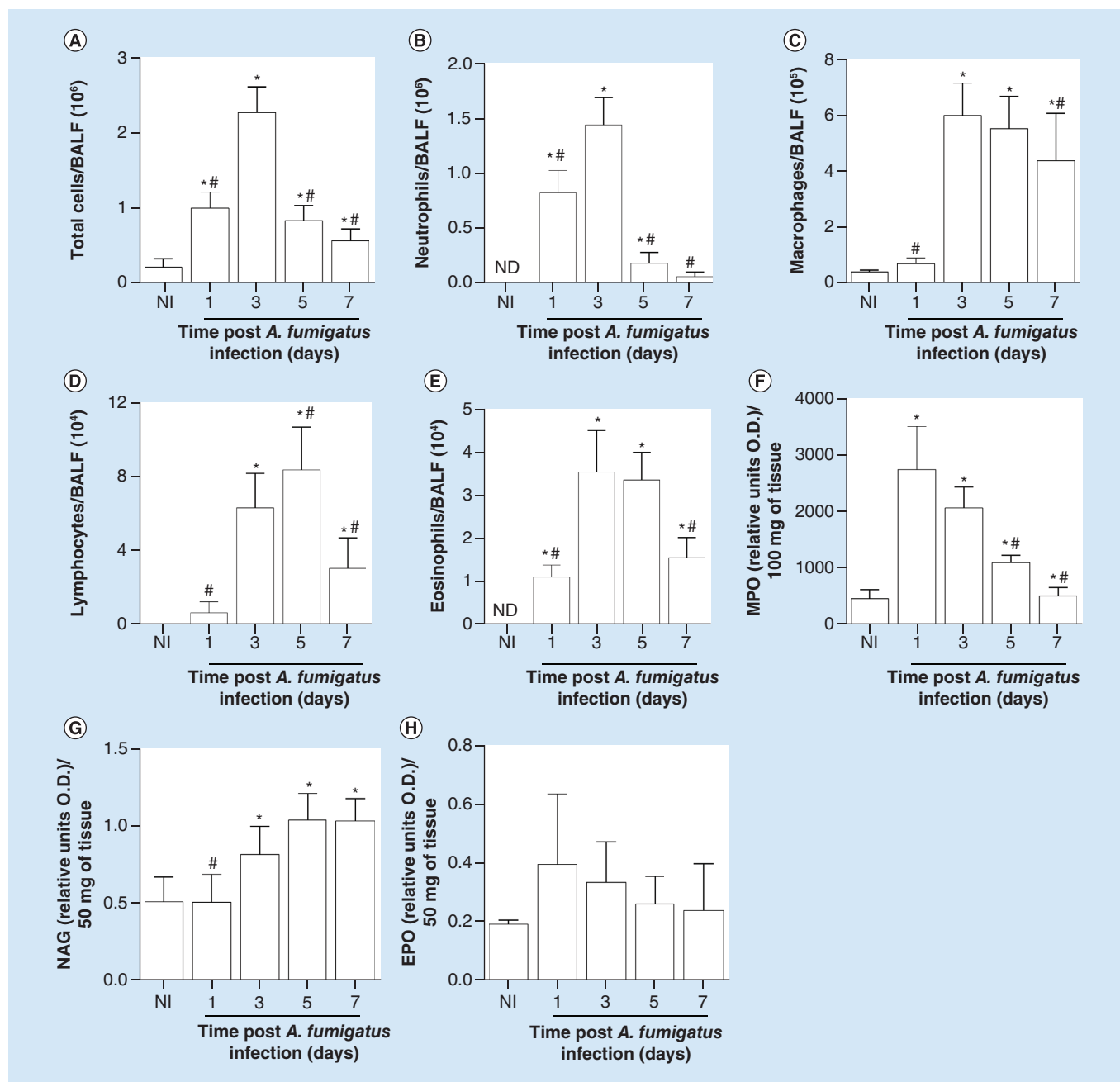


Figure 3. Inflammatory infiltrate into airways and activation of apoptotic events during *Aspergillus fumigatus* infection. Mice were infected via intranasal with 1×10^8 conidia of *A. fumigatus*. BALFs and lungs were harvested at 1, 3, 5 and 7 days after infection for inflammatory cell infiltrates determination. (A) Total cells, (B) neutrophils, (C) macrophages, (D) lymphocytes, (E) eosinophils, (F) MPO (G) NAG and (H) EPO. Experiments were done at least three-times. Data are presented as Mean \pm standard deviation (n = five to seven mice per group).

*Statistically significant difference ($p < 0.05$) against noninfected control; #statistically significant against the 3 days of infection group. BALF: Bronchoalveolar lavage fluid; EPO: Eosinophil peroxidase; MPO: Myeloperoxidase; NAG: N-acetylglucosaminidase.

infiltrate into the lung tissue after day 3 of *A. fumigatus* infection and maintain this pattern until day 7 of infection (Figure 3G). Eosinophil peroxidase levels has a close similarity from noninfected mice (Figure 3H).

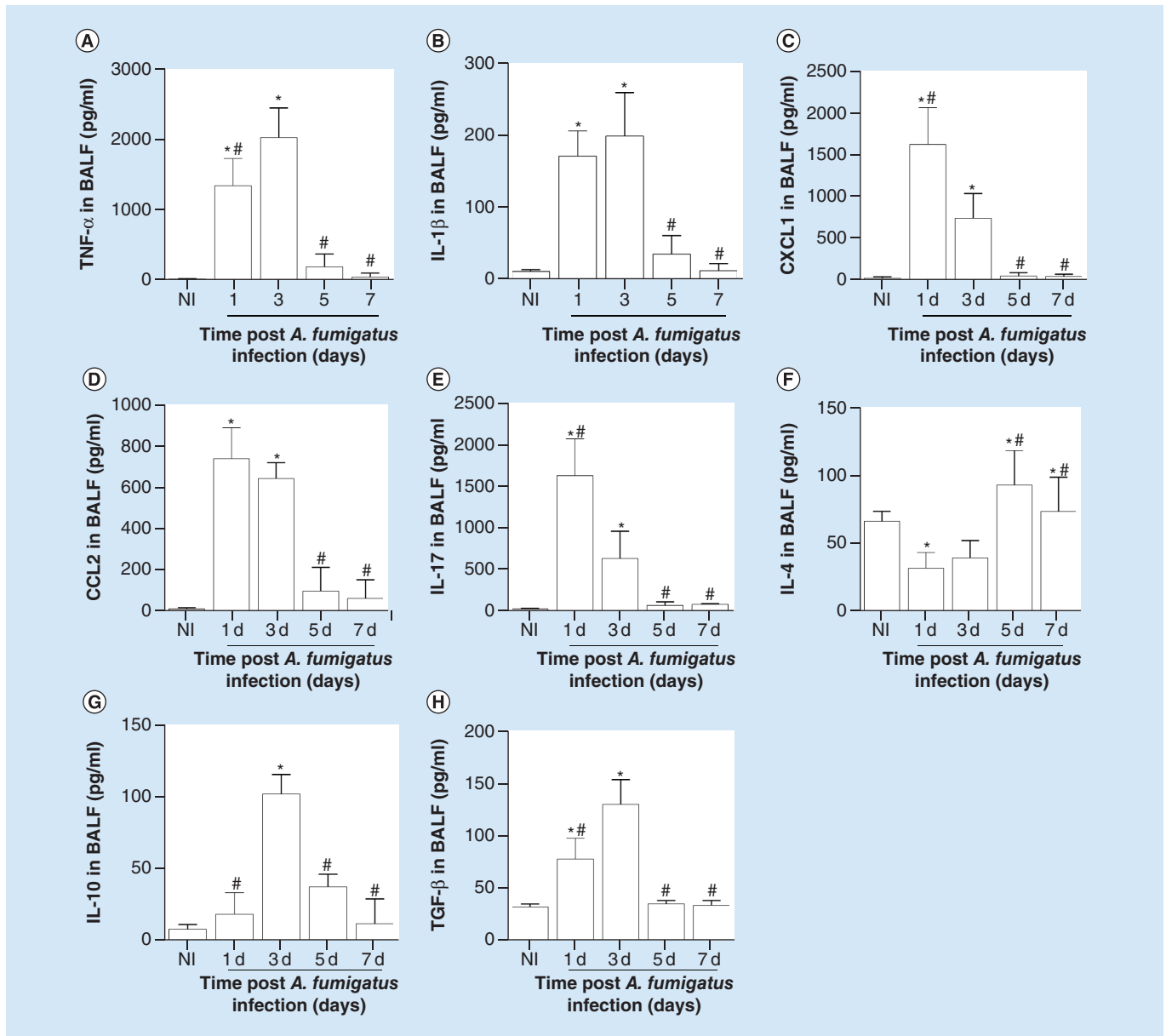


Figure 4. Cytokine release after *Aspergillus fumigatus* infection. Mice were infected via intranasal with 1×10^8 conidia of *A. fumigatus*. BALFs and lungs were harvested at 1, 3, 5 and 7 days after infection. Samples were centrifuged and supernatants were used to measure cytokine levels by ELISA. (A) TNF- α , (B) IL-1 β , (C) CXCL1, (D) CCL2, (E) IL-17, (F) IL-4 (G) IL-10 (H) TGF- β . Experiments were done at least three times. Data are presented as mean \pm standard deviation (n = five to seven mice per group).

*Statistically significant difference ($p < 0.05$) against noninfected control; #statistically significant against the 3 days of infection group. BALF: Bronchoalveolar lavage fluid.

Pattern of cytokine & chemokine production into the airways after *A. fumigatus* infection in immunocompetent mice

Inflammatory cell transmigration is a complex process that requires inflammatory signals such as cytokine and chemokine production [30]. To understand the pattern of cytokine profiles on inflammatory cell recruitment mediated by *A. fumigatus* infection, we evaluate the concentrations of key cytokines and chemokines in the BALF and lung after infection. We found very similar release of the inflammatory cytokines TNF- α , IL-1 β , the chemokines CXCL1, CCL2 and the Th17-related cytokine, IL-17 after infection. All these mediators had a significantly increase between days 1 and 3 of infection, compared with noninfected mice (Figure 4A–E). Furthermore, IL-4 levels were maintained lower compared with control mice until day 5 and 7 of infection, when reached a peak of release (Figure

4F). High levels of IL-10 was observed at day 3 of infection, and returned to baseline levels at day 5 (Figure 4G). On the other hand, TGF- β increase its levels at day 1 of infection and reaches a peak at day 3, when decreased gradually (Figure 4H).

Histopathological analysis

We next investigated the kinetics of cellular infiltrate in lung tissue from *A. fumigatus*-infected mice by histological lung preparations to assess tissue damage at 1, 3 and 7 days of infection. Data showed that compared with noninfected group (Figure 5A & B), the response to *A. fumigatus* infection is characterized by mild and focal inflammatory infiltrates around blood vessels, bronchiole and in the alveolar wall, at 1 day of infection (Figure 5C & D). These foci are characterized by infiltration of neutrophils and occasional macrophages mixed with fungal structures. At day 3 post infection, multifocal to coalescing inflammatory areas mainly located around blood vessels, bronchiole and extending to alveolar septa are visualized. There were also destruction of bronchiolar wall and accumulation of cellular debris mixed with neutrophils, macrophages and fungi in the lumen. Numerous conidia and occasional hyphae were detected in the necroinflammatory areas, mainly in the bronchiolar and septal parenchyma (Figure 5E & F). After 7 days of *A. fumigatus* infection, the amount of cellular infiltrate is very sparse (Figure 5G & H), consistent with fungal load at 3 days post infection (Figure 2D), suggesting that the histopathological changes will resolve spontaneously. After 14 days of infection, histological images are broadly similar to noninfected group (data not shown). We also quantified the infiltrate parameters observed in histological slides. The lesions severity and distribution caused by inflammation was quantified in an inflammatory score. Lungs from immunocompetent mice during *A. fumigatus* infection displayed variable degrees of inflammatory lesions characterized by a higher vascular permeability accompanied to cellular infiltrates, mainly located around blood vessels and bronchia/bronchiole in the early time points analyzed. (Figure 5I). Vascular permeability was assessed by plasmatic proteins extravasation at the indicated time points. We found that after 3 days of *A. fumigatus* infection, mice had an increase in vascular permeability (Figure 5J). Additionally, we evaluated fibrosis in the lung tissue, by hydroxyproline contents, and we observed that *A. fumigatus* did not changed hydroxyproline content after infection (Figure 5K). Moreover, the amount of nitrite, an indirect measure of nitric oxide production, was found with a peak at day 3 of infection, time point with more intense inflammatory response (Figure 5L). Conidia or other fungal elements were not identified with this staining.

Pulmonary dysfunction after acute *A. fumigatus* infection

To determinate the effects of tissue damage caused by acute *A. fumigatus* infection on lung function we performed lung volume tests, FVC and inspiratory capacity. *Aspergillus fumigatus*-infected mice had loss of lung volume at day 1. Importantly, there was a substantial decrease in FVC test in mice after 1 day of infection. Similarly, IC test was reduced after 1 and 3 days of infection compared with noninfected mice, suggesting that after acute *A. fumigatus* infection mice have loss of respiratory area and lung septa thickening (Figure 6A & B). Cdyn, Static compliance are used to measure lungs' elastic properties, such as lung's ability to stretch and expand. Data showed that *A. fumigatus* inoculation statistically decreased Cdyn in mice both 1 and 3 days of infection compared with noninfected mice (Figure 6C & D). Lung resistance is the resistance of respiratory tract to the airflow movement during normal aspiration and expiration. We found that *A. fumigatus* infection statistically increased RI in mice both 1 and 3 days of infection compared with noninfected group (Figure 6E). In addition, we performed FEV at 20, 50 and 100 milliseconds to test the loss of volume exhaled after the fungal exposure. We observed that while control mice group were capable of increasing FEV from 20 to 100 ms, intranasally infected mice maintained the same values after 1 and 3 days of infection, indicating that fungal infection possibly decrease mice airflow into airways (Figure 6F–H). Taken together, these results corroborate our findings in the lung tissue with indirectly determination of the inflammatory cell load and suggests that the early time of *A. fumigatus* infection is responsible for more inflammatory infiltrate and loss of important pulmonary function in mice.

Spontaneous resolution of acute *Aspergillus fumigatus* infection is associated with neutrophil apoptosis

A. fumigatus infection exhibited a spontaneous resolution of neutrophilic inflammation, which was associated with an increase in the number of apoptotic events. As seen from 5 days of infection, there was a rise of about 19% of apoptotic neutrophils in mice and reached the highest point at 7 days of infection (31%), compared with 1 day infected mice (Figure 7A). Related to efferocytosis, there was a slight raise after 5 days of infection of 3.44% and

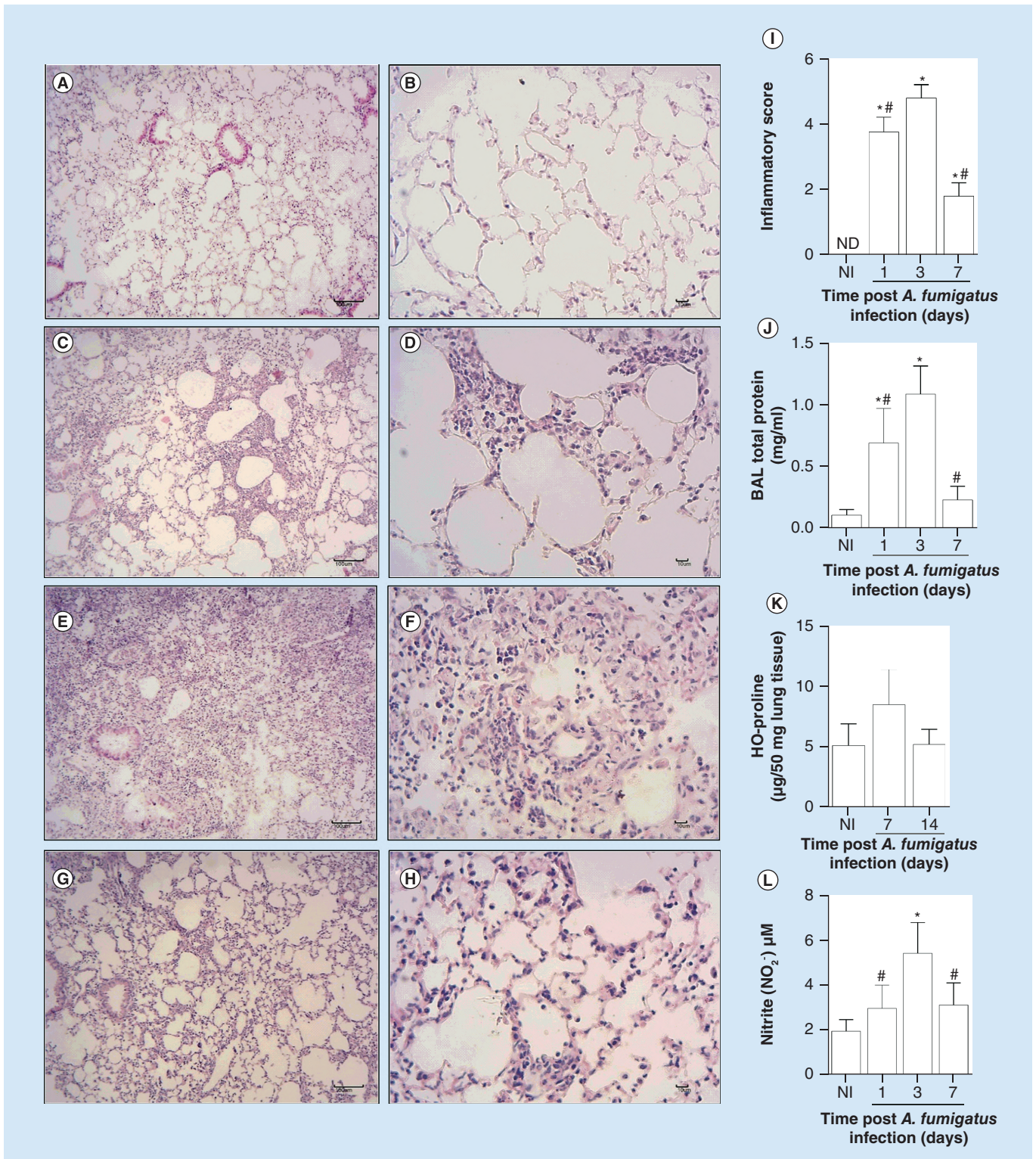


Figure 5. Histopathological changes during acute pulmonary *Aspergillus* infection. Mice were infected via intranasal 1×10^8 conidia of *A. fumigatus*. BALFs and lungs were harvested at 1, 3, 5 and 7 days after infection. Lungs were fixed in formaldehyde 4% (w/v) and embedded in paraffin. Sample sections were stained with hematoxylin and eosin. (A & B) Control NI group, (C & D) 1 day of infection, (E & F) 3 days of infection (G & H) 7 days of infection. Bars in A, C, E and G represent 100 µm, while bars in B, D, F and H represent 10 µm. (I) Inflammatory score. Histological changes were graded to inflammatory lesions severity and distribution. (J) Total protein in BALFs were quantified as an indirect measure of vascular permeability. (K) Lung collagen deposition was measure by determination of hydroxyproline concentration. (L) Nitrite measured in BALFs. Experiments were done at least three times. Data are presented as mean \pm standard deviation (n = five to seven mice per group).

*Statistically significant difference ($p < 0.05$) against noninfected control; #statistically significant against the 3 days of infection group. BALF: Bronchoalveolar lavage fluid.

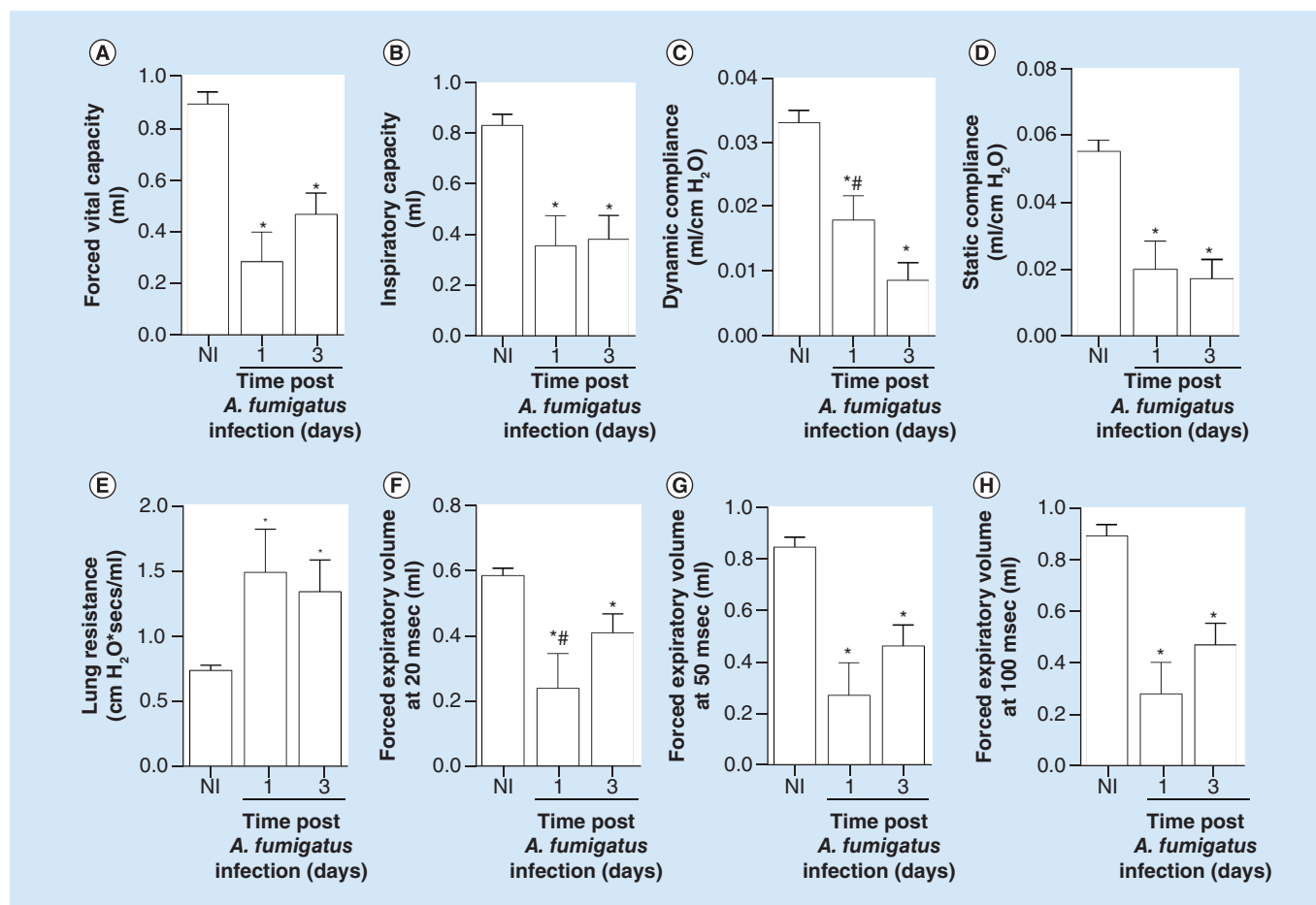


Figure 6. Pulmonary mechanics after *Aspergillus fumigatus* infection in mice. Mice were infected via intranasal 1×10^8 conidia of *A. fumigatus*. Then forced spirometry was performed to investigate injury by modifications in lung functions. Parameters assessed were lung volumes, as presented by (A) forced vital capacity and (B) inspiratory capacity, lung's ability to stretch and expand, by measuring (C) dynamic compliance (D) static compliance and (E) RI and volume exhaled at 20, 50 and 100 ms, evaluated by (F) forced expiratory volume (FEV)20, (G) FEV50, (H) FEV100. Experiments were done at least three times. Data are presented as mean \pm standard deviation (n = five to seven mice per group).

*Statistically significant difference ($p < 0.05$) against noninfected control; #statistically significant against the 3 days of infection group.

reached a peak at 7 days after *A. fumigatus* infection (10.44%) (Figure 7B). In addition, we evaluated the resolution indexes and, after the fungal-induced inflammation, there is an intense neutrophil influx to the airways at 24 h of infection, reaching a peak at 72 h of infection. After that, neutrophils numbers progressively decrease until 168 h of infection, when the complete spontaneous resolution of inflammation occurs, with a resolution index of 36 h (Figure 7C).

Discussion

In the future, millions of people will still suffer and dying of lung diseases, including asthma, chronic obstructive pulmonary disease (COPD), lung cancer, pulmonary fibrosis, sepsis and pneumonia [31]. Fungal infections, especially pneumonia, is related to host immunosuppression. In this way, there are innumerable models of fungal infection in immunocompromised animals and a few characterized animal models in immunocompetent hosts that represent important models to the study of pathogenicity of different fungal isolates and the relationship in host-pathogen during depression of immune system [13,17,18,32–35]. In the present study, we characterize a model of acute pulmonary *Aspergillus* infection in an immunocompetent host by a single nasal instillation of *A. fumigatus*. Our main findings were the relation between intense inflammatory cell recruitment and proinflammatory cytokine release with pulmonary dysfunction in early times of infection; spontaneous resolution, with reduction of inflammatory stimuli, increase of proresolving cytokine release and apoptosis and efferocytosis of neutrophils aiming tissue homeostasis.

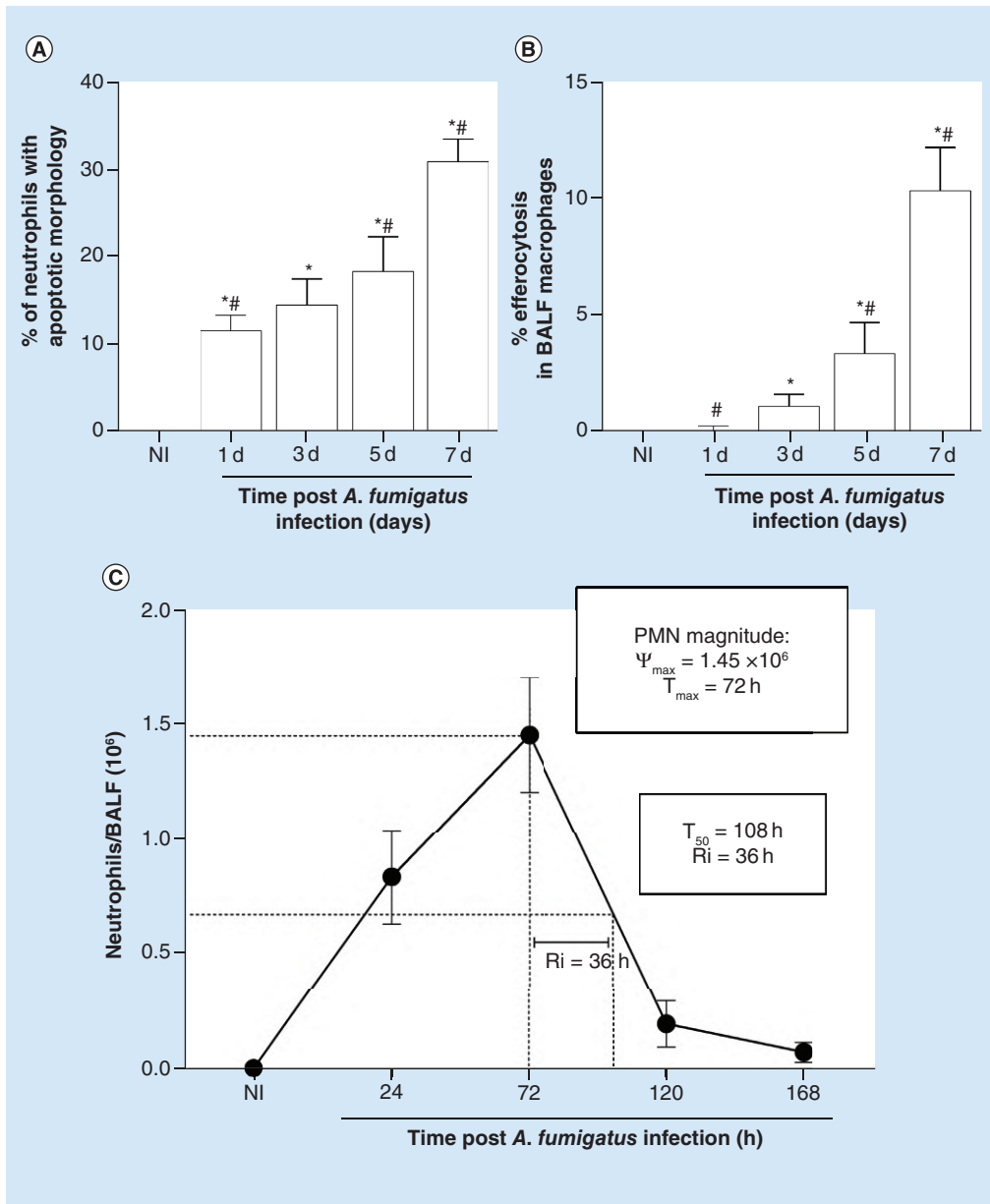


Figure 7. Spontaneous resolution of *Aspergillus fumigatus* infection. Mice were infected via intranasal with 1×10^8 conidia of *A. fumigatus*. broncoalveolar lavage fluids were harvested at 1, 3, 5 and 7 days after infection for inflammatory cell infiltrates determination by cytospin preparations. Cells with distinctive apoptotic morphology was evaluated (A) apoptosis, (B) efferocytosis and (C) resolution index. Experiments were done at least three times. Data are presented as mean \pm standard deviation (n = five to seven mice per group).

*Statistically significant difference ($p < 0.05$) against noninfected control; #statistically significant against the 3 days of infection group.

PMN: Polymorphonuclear.

The initial results demonstrated the infection profile in two different inocula. In the lower inoculum, lethality was around 25%, while in the higher inoculum, we found about 50% mortality. Also, we found an intense body weight loss in both inocula from 3 to 6 days of infection. This morbidity is probably associated with fungal presence into the lungs, which become lower along the course of infection, as long as neutrophils arrived. Our results did not show fungal colonization of the lungs indicating that lethality is due to an intense inflammatory response in the immunocompetent mice. Indeed, our results are in accordance with literature that demonstrated no lethality

in immunocompetent mice, using different clinical isolates and inocula [14,21,36]. However, lethality was observed only in neutropenic models of *Aspergillus* infection, such as Gr1/Ly6G monoclonal antibody treatment [21].

The pattern of cellular response in infectious site is essential to understand the host-pathogen interactions in the outcome of pneumonia [37]. We found that the *A. fumigatus* infection recruited neutrophils, eosinophils and lymphocytes to the alveoli in early phases of infection, whereas neutrophils were the most prevalent cell type in BALF. Neutrophils recruited to an inflammatory site have a critical role against growing conidia and hyphae by several mechanisms, both intra and extracellular. These mechanisms are phagocytosis, neutrophils extracellular traps and degranulation [38]. The timely neutrophil apoptosis is an essential event to resolve an acute inflammation [39]. In our study, after 3 days of infection, resolution of inflammation takes place by neutrophil apoptosis. The resolution of a single exposure of *A. fumigatus* is a spontaneous process that occurs in about 7 days after the infection. During the resolution phase of the inflammatory process, recruited neutrophils to the lung tissue undergo apoptosis. Macrophages are responsible for recognition and efferocytosed these apoptotic neutrophils. Moreover, MPO assay showed a large number of neutrophils in the first day after infection and progressively decrease these cells without deposition of collagen and development of fibrosis. Taken together, these results indicate a protective role of neutrophils and eosinophils in *A. fumigatus*-mediated lung inflammation.

Alveolar macrophages play a crucial role in phagocytosis of *A. fumigatus*-inhaled conidia, in healthy individuals [13]. They are responsible for both activating the proinflammatory response and promoting inflammation resolution [40]. Accumulation of macrophages occurred 3 days after challenge and remains high until the day 7, suggesting an important role of macrophage in tissue homeostasis in *Aspergillus* infection. Furthermore, efferocytosis was also identified after *A. fumigatus* inoculation and had its higher level at 7 days of infection, the same time point of the apoptosis peak. Even though innate immune cells are involved in controlling *A. fumigatus* infection, we found in our *Aspergillus* infection model that lymphocytes take place in inflammation after 3 days of infection. Adaptive response, more specifically T cell-mediated response against the main *Aspergillus* species is not well understood. However, some studies have shown the importance of participation of lymphocytes in fungal infections [15].

We found an intense inflammatory reaction in the initial phase of the infection, characterized by the release of TNF- α , IL-1 β , CXCL1, CCL2 and IL-17. The peak of inflammation is at the third day of infection and progressively decreases until the seventh day of infection, when proresolving and anti-inflammatory mediators such as IL-10, IL-4, TGF- β are released. Studies have been demonstrated important mediators for the course of *A. fumigatus* infection, as IL-1 α , IL-1 β [41], IL-6 [14], CCL11 [42], IL-23 and IL-17 [43] and IL-10 [17]. Recently, Su *et al.* showed that *A. fumigatus* infection increased IL-6, CXCL1 and IL-17 levels at the early phase of infection, while IL-10 were greatly released after 5 days of infection [17]. In addition, in our model, we were not able to detect significant differences in IFN- γ levels in BALF after *Aspergillus* infection (data not shown). Similar findings were observed both in immunocompromised [17] and immunocompetent mice [22], in which IFN- γ levels were remarkably low.

We found a valuable association between histologic analysis, cytokine and chemokine release, vascular permeability, fungal burden and pulmonary dysfunction in the infection. We demonstrate that vascular permeability is elevated in early infection, while HE staining and inflammatory score have the same pattern. Related to fungal load, CFUs after 3 days of infection are statistically reduced and probably undetectable after this time point. Following fungal load, which is elevated after 1 day of infection, and due the vast cellular recruitment, there is also pulmonary dysfunction. The tissue injury triggered by inflammation causes loss of volume, elasticity and diminution of airflow into the lungs. Similar findings were previously observed in *A. fumigatus* infection in BALB/C and Δ dblGATA-1 knockout mice [23], *Ascaris suum* infection [44] and pulmonary fibrosis [28] that cause pulmonary injury associated with alterations in lung physiologic parameters. A study with *A. fumigatus* infection in immunocompetent mice have been demonstrated increase of inflammatory cell infiltration in lungs starting at before 24 h of infection, reaching a peak in 48 h and decrease after that time point [14].

It is extremely important to completely understand inflammatory parameters in fungal pneumonia in immunocompetent hosts and the therapeutic forms of intervention that should be used to modulate immune response. Based on that, it could be possible to apply similar interventions in immunocompromised hosts. These observations are confirmed by animal studies that demonstrated the practicability of changing the outcome of pneumonia by increasing or depleting specific inflammatory mediators [45].

Conclusion

Taken together, our results characterize a murine model of fungal pneumonia in immunocompetent mammal host. Moreover, we demonstrate histologically, physiologically and biochemically, the inflammatory response during the course of infection. Our model opens an array of possibilities for the study of fungal pulmonary infections with emphasis in the virulence determination of different fungal strains and isolates, inflammatory host response, drug target characterization and development, studies of coinfection, studies of comorbidities and elucidation of inflammatory events such as the resolution process. These characteristics in this model of pulmonary infection allow the development of studies focused even in the set up though in the resolution of inflammatory processes. Furthermore, every kind of host–pathogen interactions, including identification of *Aspergillus* virulence factors, studies of coinfection with viruses, other fungi or bacteria, studies of comorbidities such as alcoholism and chronic diseases, and inflammatory processes such as resolution in infectious self-limited conditions, could be assessed using this approach.

Summary points

- We demonstrate histologically, physiologically and biochemically, the inflammatory response during the course of *Aspergillus fumigatus* infection.
- We observed that *A. fumigatus* infection had an inoculum-dependent lethality and body weight loss.
- *A. fumigatus* infection cause an intense inflammatory cell infiltrate to the airways composed mainly by neutrophils, accompanied with pulmonary dysfunction in the early phases of infection.
- TNF- α , IL-1 β , CXCL1, CCL2 and IL-17 are released in the initial phase of the infection. The peak of inflammation is at the third day of infection and progressively decreases until the seventh day of infection, when proresolving and anti-inflammatory mediators, such as IL-10, IL-4, TGF- β , are released.
- *A. fumigatus* infection induced an inflammatory process leading to fungal clearance and with spontaneous resolution.
- Our model opens an array of possibilities for the study of inflammation and every kind of host–pathogen interactions.

Financial & competing interests disclosure

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), grant numbers APQ-01756-10, APQ-02198-14 and APQ-03950-17; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES), finance code 001; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), grant numbers 474528-2012-0 and 483184-2011-0; Universidade Federal de Minas Gerais and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) em Dengue e Interação Microorganismo-Hospedeiro. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

Ethical conduct of research

The authors state that they have obtained appropriate institutional review board approval or have followed the principles outlined in the Declaration of Helsinki for all human or animal experimental investigations. The animal ethics committee of Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA/UFMG) approved all animal experiments, protocol number 62/2011, according to Brazilian national guidelines on animal work.

References

Papers of special note have been highlighted as: • of interest

1. Cordoba E, Maduro G, Huynh M, Varma JK, Vora NM. Deaths from pneumonia -New York City, 1999-2015. *Open Forum Infect. Dis.* 5(2), 1–9 (2018).
 2. National Institutes of Health: National Heart, Lung, and Blood Institute. Morbidity & mortality: 2012 Chart Book on Cardiovascular, Lung, and Blood Diseases (2012). <http://www.nhlbi.nih.gov/files/docs/research/2012.ChartBook.pdf>
 3. Daltro P, Santos EN, Gasparetto TD, Ucar ME, Marchiori E. Pulmonary infections. *Pediatr. Radiol.* 41(Suppl. 1), S69–S82 (2011).
 4. Mason CM, Nelson S. Pulmonary host defenses and factors predisposing to lung infection. *Clin. Chest Med.* 26(1), 11–17 (2005).
 5. Alcón A, Fàbregas N, Torres A. Pathophysiology of pneumonia. *Clin. Chest Med.* 26(1), 39–46 (2005).
- ***Aspergillus fumigatus* infections and inflammatory response of infection.**

6. Brieland JK, Jackson C, Menzel F *et al.* Cytokine networking in lungs of immunocompetent mice in response to inhaled *Aspergillus fumigatus*. *Infect. Immun.* 69(3), 1554–1560 (2001).
7. Lamoth F, Alexander BD. Nonmolecular methods for the diagnosis of respiratory fungal infections. *Clin. Lab. Med.* 34(2), 315–336 (2014).
8. Dagenais TRT, Keller NP. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in invasive aspergillosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 22(3), 447–465 (2009).
9. Latgé JP. The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. *Trends Microbiol.* 9(8), 382–389 (2001).
10. Latgé J. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 12(2), 310–350 (1999).
11. Kwon-Chung KJ, Sugui JA. *Aspergillus fumigatus*-What makes the species a ubiquitous human fungal pathogen? *PLoS Pathog.* 9(12), 1–4 (2013).
12. Margalit A, Kavanagh K. The innate immune response to *Aspergillus fumigatus* at the alveolar surface. *FEMS Microbiol. Rev.* 39(5), 670–687 (2015).
13. Perez-Nadales E, Almeida Nogueira MF, Baldin C *et al.* Fungal model systems and the elucidation of pathogenicity determinants. *Fungal Genet. Biol.* 70(100), 42–67 (2014).
14. Duong M, Ouellet N, Simard M, Bergeron Y, Olivier M, Bergeron MG. Kinetic study of host defense and inflammatory response to *Aspergillus fumigatus* in steroid-induced immunosuppressed Mice. *J. Infect. Dis.* 178(5), 1472–1482 (1998).
15. Thakur R, Anand R, Tiwari S, Singh AP, Tiwari BN, Shankar J. Cytokines induce effector T-helper cells during invasive aspergillosis; what we have learned about T-helper cells? *Front. Microbiol.* 6(5), 1–6 (2015).
16. Clemons KV, Stevens DA. The contribution of animal models of aspergillosis to understanding pathogenesis, therapy and virulence. *Med. Mycol.* 43(s1), 101–110 (2005).
17. Su H, Li C, Wang Y *et al.* Kinetic host defense of the mice infected with *Aspergillus fumigatus*. *Future Microbiol.* 14(8), 705–716 (2019).
18. Desoubeaux G, Cray C. Rodent models of invasive aspergillosis due to *Aspergillus fumigatus*: still a long path toward standardization. *Front. Microbiol.* 8(841), 1–31 (2017).
19. Desoubeaux G, Cray C. Animal models of aspergillosis. *Comp Med.* 68(2), 109–123 (2018).
20. Scriven JE, Tenforde MW, Levitz SM, Jarvis JN. Modulating host immune responses to fight invasive fungal infections. *Curr. Opin. Microbiol.* 40, 95–103 (2017).
21. Silva RLH, Rosa-milani E, Brunaldi MO, Maffei CML. Murine model of invasive pulmonary aspergillosis: follow-up of tissue injury, fungal burden and mortality with distinct elastase production strains. *J. Mycol. Med.* 29(2), 112–119 (2018).
22. Kalleda N, Amich J, Arslan B *et al.* Dynamic immune cell recruitment after murine pulmonary *Aspergillus fumigatus* infection under different immunosuppressive regimens. *Front. Microbiol.* 13(7), 1107 (2016).
23. Malacco NLSO, Rachid MA, Gurgel ILS *et al.* Eosinophil-associated innate IL-17 response promotes *Aspergillus fumigatus* lung pathology. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 8, 453 (2019).
24. Russo RC, Guabiraba R, Garcia CC *et al.* Role of the chemokine receptor CXCR2 in bleomycin-induced pulmonary inflammation and fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 40(4), 410–421 (2009).
25. Hubbs AF, Castranova V, Ma JY *et al.* Acute lung injury induced by a commercial leather conditioner. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 143(1), 37–46 (1997).
26. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72(1–2), 248–254 (1976).
27. Tsikas D. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: appraisal of the Griess reaction in the l-arginine/nitric oxide area of research. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 851(1–2), 51–70 (2007).
28. Russo RC, Savino B, Mirolo M *et al.* The atypical chemokine receptor ACKR2 drives pulmonary fibrosis by tuning influx of CCR2+ and CCR5+ IFN γ -producing $\gamma\delta$ T cells in mice. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 6(314), L1010–1025 (2018).
29. Vago JP, Tavares LP, Sugimoto MA *et al.* Proresolving actions of synthetic and natural protease inhibitors are mediated by annexin A1. *J. Immunol.* 196(4), 1922–1932 (2016).
30. Muller WA. Mechanisms of transendothelial migration of leukocytes. *Circ. Res.* 105(3), 223–230 (2009).
31. Williams K, Roman J. Studying human respiratory disease in animals - role of induced and naturally-occurring models. *J. Pathol.* 238(2), 220–232 (2015).
32. Koyasu S, Moro K. Role of innate lymphocytes in infection and inflammation. *Front. Immunol.* 3, 101 (2012).
33. Kim J-Y. Human fungal pathogens: why should we learn? *J. Microbiol.* 54(3), 145–148 (2016).
34. Perfect JR. The impact of the host on fungal infections. *Am. J. Med.* 125(Suppl. 1), S39–S51 (2012).
35. Smith JA, Kauffman CA. Pulmonary fungal infections. *Respirology* 17(6), 913–926 (2012).
36. Wong SSW, Rasid O, Laskaris P *et al.* Treatment of Cyclosporin A retains host defense against invasive pulmonary aspergillosis in a non-immunosuppressive murine model by preserving the myeloid cell population. *Virulence* 8(8), 1744–1752 (2017).

37. Croft CA, Culibrk L, Moore MM, Tebbutt SJ. Interactions of *Aspergillus fumigatus* conidia with airway epithelial cells: a critical review. *Front. Microbiol.* 7, 472 (2016).
38. Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 13(3), 159–175 (2013).
39. Vago JP, Nogueira CRC, Tavares LP *et al.* Annexin A1 modulates natural and glucocorticoid-induced resolution of inflammation by enhancing neutrophil apoptosis. *J. Leukoc. Biol.* 92(2), 249–258 (2012).
40. McCormick SM, Heller NM. Regulation of macrophage, dendritic cell, and microglial phenotype and function by the SOCS proteins. *Front. Immunol.* 6, 549 (2015).
41. Caffrey-carr AK, Kowalski CH, Beattie SR *et al.* Interleukin 1 α is critical for resistance against highly virulent *Aspergillus fumigatus* isolates. *Infect. Immun.* 85(12), e00661–17 (2017).
42. O’Dea EM, Amarsaikhan N, Li H *et al.* Eosinophils are recruited in response to chitin exposure and enhance Th2-mediated immune pathology in *Aspergillus fumigatus* infection. *Infect. Immun.* 82(8), 3199–3205 (2014).
43. Guerra ES, Lee CK, Specht CA *et al.* Central role of IL-23 and IL-17 producing eosinophils as immunomodulatory effector cells in acute pulmonary aspergillosis and allergic asthma. *PLoS Pathog.* 13(1), e1006175 (2017).
44. Nogueira DS, Henrique P, Barbosa S *et al.* Multiple exposures to *Ascaris suum* induce tissue injury and mixed Th2 / Th17 immune response in mice. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10(1), e0004382 (2016).
45. Van Heeckeren AM, Tschekuna J, Walenga RW *et al.* Effect of Pseudomonas infection on weight loss, lung mechanics, and cytokines in mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 161(1), 271–279 (2000).

**5 CAPÍTULO 2 – O EFEITO DO CONSUMO CRÔNICO DE ETANOL NA INFECÇÃO
POR *Aspergillus fumigatus* (artigo)**

Chronic ethanol consumption compromises neutrophil function in acute pulmonary *Aspergillus fumigatus* infection

Nathalia Luisa Sousa de Oliveira Malacco^{1*}, Jessica Amanda Marques Souza¹, Flavia Rayssa Braga Martins¹, Milene Alvarenga Rachid², Janaina Aparecida Simplicio³, Carlos Renato Tirapelli³, Adriano de Paula Sabino⁴, Celso Martins Queiroz-Junior⁵, Grazielle Ribeiro Goes⁶, Leda Quercia Vieira⁷, Danielle Glória Souza⁸, Vanessa Pinho⁵, Mauro Martins Teixeira⁷, Frederico Marianetti Soriani^{1*}

¹Department of Genetics, Ecology and Evolution, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil; ²Department of Pathology, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil; ³Department of Psychiatric Nursing and Human Sciences, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil; ⁴Department of Clinical and Toxicological Analysis, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil; ⁵Department of Morphology, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil; ⁶Department of Biology, Universidade do Estado de Minas Gerais, Divinópolis, Brazil; ⁷Department of Biochemistry and Immunology, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil; ⁸Department of Microbiology, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

***For correspondence:**

nathalia2@gmail.com (NLSOM);
fredsori@gmail.com (FMS)

Competing interests: The authors declare that no competing interests exist.

Funding: See page 19

Received: 20 May 2020

Accepted: 22 July 2020

Published: 23 July 2020

Reviewing editor: Frank L van de Veerdonk, Radboud University Medical Center, Netherlands

© Copyright Malacco et al. This article is distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use and redistribution provided that the original author and source are credited.

Abstract Chronic ethanol consumption is a leading cause of mortality worldwide, with higher risks to develop pulmonary infections, including *Aspergillus* infections. Mechanisms underlying increased susceptibility to infections are poorly understood. Chronic ethanol consumption induced increased mortality rates, higher *Aspergillus fumigatus* burden and reduced neutrophil recruitment into the airways. Intravital microscopy showed decrease in leukocyte adhesion and rolling after ethanol consumption. Moreover, downregulated neutrophil activation and increased levels of serum CXCL1 in ethanol-fed mice induced internalization of CXCR2 receptor in circulating neutrophils. Bone marrow-derived neutrophils from ethanol-fed mice showed lower fungal clearance and defective reactive oxygen species production. Taken together, results showed that ethanol affects activation, recruitment, phagocytosis and killing functions of neutrophils, causing susceptibility to pulmonary *A. fumigatus* infection. This study establishes a new paradigm in innate immune response in chronic ethanol consumers.

Introduction

Ethanol abuse is a leading cause of mortality worldwide (*World Health Organisation, 2014*). Chronic alcohol consumption has been correlated, as a comorbidity, to a wide range of health conditions, including alcoholic liver diseases, cirrhosis and cancers (*Szabo and Saha, 2015; Pritchard and Nagy, 2005; Szabo, 1999; Bautista, 1999; Luján et al., 2010*). Moreover, alcohol abusers are prone to develop severe lung inflammatory and infectious diseases, including acute respiratory distress syndrome (ARDS) (*Liang et al., 2012*), pneumonia caused by *Streptococcus pneumoniae* (*Treveje-Nunez et al., 2015; Tsuchimoto et al., 2015; Boé et al., 2001*), *Klebsiella pneumoniae* (*Yeligar et al., 2014; Ohama et al., 2015*), Respiratory Syncytial Virus (RSV) infection

eLife digest Alcoholism is a chronic disease that has many damaging effects on the body. Over long periods, excessive alcohol intake weakens the immune system, putting consumers at increased risk of getting lung infections such as pneumonia.

Some forms of pneumonia can be caused by the fungus *Aspergillus fumigatus*. This microbe does not tend to be a problem for healthy individuals, but it can be fatal for those with impaired immune systems. Here, Malacco et al. wanted to find out why excessive alcohol consumers are more prone to pneumonia.

To test this, the researchers used two groups of mice that were either fed plain water or water containing ethanol. After 12 weeks, both groups were infected with *Aspergillus fumigatus*. The results showed that alcohol-fed mice were more susceptible to the infection caused by strong inflammation of the lungs.

Normally, the immune system confronts a lung infection by activating a group of defense cells called neutrophils, which travel through the blood system to the infection site. Once in the right spot, neutrophils get to work by releasing toxins that kill the fungus. Malacco et al. discovered that after chronic alcohol consumption, neutrophils were less reactive to inflammatory signals and less likely to reach the lungs. They were also less effective in dealing with the infection. Neutrophil released fewer toxins and were thus less able to kill the microbial cells.

These findings demonstrate for the first time how alcohol can affect immune cells during infection and pave the way for new possibilities to prevent fatal lung infections in excessive alcohol consumers. A next step would be to identify how alcohol acts on other processes in the body and to find a way to modulate or even revert the changes it causes.

(Meyerholz et al., 2008) and aspergillosis (Blum et al., 1978; Gustot et al., 2014). The mechanisms associated with this increased risk of disease and death are poorly understood, however studies have suggested that certain aspects of immune function may be altered by chronic ethanol intake (D'Souza El-Guindy et al., 2007; Lippai et al., 2013; Yen et al., 2017; Zhang et al., 2015; Gurung et al., 2009).

Aspergillus fumigatus is a ubiquitous and saprophytic fungus whose conidia are inhaled by humans on a daily basis (Latgé, 1999). Immunocompromised individuals are considered the risk group to develop the pulmonary invasive aspergillosis (IA) (Latgé, 2001) and mortality rates reach up to 95% (Brown et al., 2012). In normal conditions, inhaled conidia are cleared through mucociliary actions. However, if conidia pass through the initial barrier, alveolar macrophage (AM) phagocytosis takes place, resulting in a cascade of cytokine and chemokine release to recruit neutrophils to prevent fungal development (Dagenais and Keller, 2009; Caffrey-Carr et al., 2017). In all these circumstances, an altered leukocyte function may be a major risk factor for IA. Despite all advance in diagnosis and treatment, aspergillosis' morbidity and mortality remain very high. Mildly immunocompromised conditions such as diabetes mellitus, low-dose corticosteroid therapy and alcoholism has been considered as predisposing factors (Blum et al., 1978; Baddley, 2011; Kousha et al., 2011).

Neutrophils have been shown to be essential to control fungal and bacterial burden in the site of infection and avoid the spread of these microbes and consequently, survival of the host (Gazendam et al., 2016; Romani, 2000; Robertson et al., 2008; Ng et al., 2019). During a pathogen-triggered inflammatory response, neutrophils are the earliest immune effector cells recruited to a site of infection (Kolaczowska and Kubes, 2013; Sun et al., 2014; Rios-Santos et al., 2007). Neutrophil migration starts with the tethering and rolling of these cells on endothelial cells, a process mediated by selectins and their carbohydrate ligands on neutrophils and endothelial venules (Soethout et al., 2002). These interactions, together with chemokines signals such as CXCL1 and CXCL2 lead neutrophils to a crawling state through the endothelial vase (Kolaczowska and Kubes, 2013; Phillipson and Kubes, 2011). G protein-coupled receptor on rolling neutrophils binds to the chemokines and changes $\beta 2$ integrins conformation on the leukocyte surface, allowing a high affinity interaction with endothelial cells (Zemans et al., 2009).

Here, we describe that chronic ethanol consumption facilitates pulmonary infection by both *A. fumigatus* in mice. Mechanistically, chronic ethanol consumption impairs the normal neutrophil

migration to the site of infection via release of high levels of circulating chemokine CXCL1 after infection, followed by downregulation of its receptor 2 (CXCR2). Additionally, ethanol consumption is responsible for an impaired neutrophil function characterized by less phagocytosis, killing, and oxidative burst leading to elevated lung pathology in mice and accentuated mortality rates after infection.

Results

Chronic ethanol consumption did not induce systemic inflammation

To assess the relevance of ethanol chronic consumption, we characterized several parameters during chronic ethanol consumption on host before the infection (**Figure 1A**). First, we checked weight change, food and liquid consumption during ethanol treatment. We found that there was no weight change in mice during the treatment with ethanol (**Figure 1B**). Moreover, food and liquid consumption were diminished in ethanol-treated mice compared with control group (**Figure 1C and D**). Second, blood ethanol levels in mice were about 200 mg of ethanol per deciliter of whole blood while control group ethanol level were not detectable, measured by gas chromatography after 12 weeks of ethanol treatment, (**Figure 1E**). In order to verify if ethanol consumption affected hematopoiesis we analyzed bone marrow precursors and blood cell counts. Mononuclear and neutrophil counts in peripheral blood did not show differences between groups (**Figure 1F**). Chronic ethanol consumption did not affect granulocyte progenitors in bone marrow (**Supplementary file 1**). In addition, no changes were observed in ALT levels in mice serum after the ethanol treatment compared to the control mice group (data not shown). Finally, serum levels of inflammatory mediators, such as TNF- α , IL-1 β and CXCL1, have not been changed in ethanol-fed mice (**Figure 1G–I**).

Chronic ethanol consumption increased lethality and impaired pulmonary fungal clearance after *A. fumigatus* infection

After ethanol treatment, mice were intranasally infected with *A. fumigatus* conidia (**Figure 2A**). Ethanol-treated mice showed an increased lethality compared to control mice group (**Figure 2B**). In addition, weight loss was significantly higher in ethanol treated mice from days 3 to 7 after infection (**Figure 2C**). These clinical signs were accompanied by higher pulmonary fungal burden in ethanol-fed mice, demonstrating an impaired fungal clearance. Moreover, we were also able to identify hyphae into the airways of infected ethanol-treated mice, showed by red arrows at 24 hr after infection compared to control group (**Figure 2D–F**). Altogether, these results demonstrate that chronic ethanol consumption increased susceptibility to pulmonary *A. fumigatus* infection along with an impaired ability to clear the pathogen.

Ethanol consumption altered cytokine release in airways in mice after *A. fumigatus* infection

Next, we assessed cytokine and chemokine levels by ELISA after *A. fumigatus* infection to determine whether levels of inflammatory mediators in BALF supernatants were altered after ethanol consumption. We found no significant differences in the levels of neutrophil chemotactic mediator CXCL1 after *A. fumigatus* infection in BALF of ethanol-treated mice compared to control group (**Figure 3A**). Interestingly, another CXCR2 agonist and neutrophil chemotactic mediator, CXCL2 were increased at 24 hr of infection in BAL fluid of ethanol-treated mice compared to control mice (**Figure 3B**). Alcohol consumption declined IL-17 levels after 24 hr of infection (**Figure 3C**). We also observed no differences in TNF levels between control and ethanol-fed mice group (**Figure 3D**). Moreover, ethanol consumption was able to down modulate IL-1 β and IL-10 levels after fungal infection (**Figure 3E and F**). These results suggest that chronic ethanol consumption dysregulate cytokine and chemokine release post *A. fumigatus* infection.

Ethanol consumption impaired neutrophil and lymphocyte recruitment into the airways during *A. fumigatus* infection

To clarify whether the diminished fungal clearance is due to an impaired inflammatory response, we next observed cell influx into the site of *A. fumigatus* infection. Although both groups exhibited a large recruitment of total cells into the airways, ethanol-treated mice had a significant reduction of

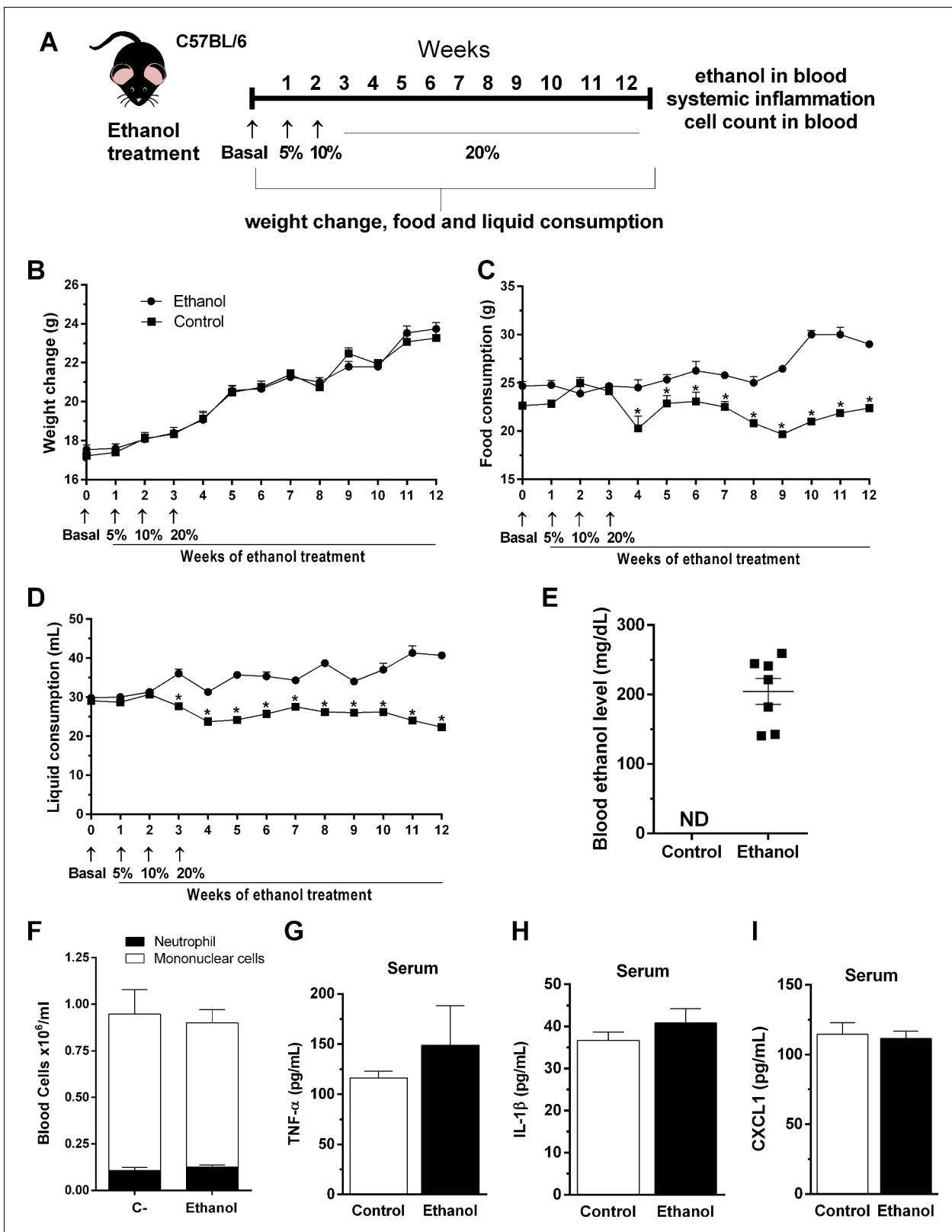


Figure 1. Outcome of chronic ethanol treatment in mice. (A) Experimental design: C57BL/6 mice received ethanol 5% (v/v) in the first week, followed by 10% (v/v) in the second week (to help mice acclimate with this intervention) and were treated during 10 weeks with ethanol 20% (v/v) in their drinking water. Control group received water. (B–D) During treatment, weight change, food and liquid consumption were measured. Data are presented as Mean ± SD (15 mice per group) *Significantly different ($p < 0.05$) in t test. After ethanol treatment, blood was collected to evaluate (E) blood ethanol level. Figure 1 continued on next page

Figure 1 continued

levels, (F) differential cell count and (G) TNF- α , (H) IL-1 β and (I) CXCL1 in serum. Data are presented as Mean \pm SD (4 to 9 mice per group) and analyzed with ANOVA test. Please, also see [Supplementary file 1](#) and [Figure 1—source data 1](#).

The online version of this article includes the following source data for figure 1:

Source data 1. Values for the outcome of ethanol treatment in mice.

recruited cells, compared to control group 24 hr after infection. However, at 48 hr after infection, there was a similar cell migration into the site of infection in both groups ([Figure 4A](#)). We demonstrate that almost all cells migrated to the airways represent neutrophils, one of the most important cells involved in killing and control of *A. fumigatus* infection ([Erwig and Gow, 2016](#)). Neutrophils and lymphocytes into airways were significantly decreased in ethanol-treated mice at 24 hr post infection ([Figure 4B and C](#)). In contrast, there were no differences in macrophages and eosinophils recruited to the site of infection ([Figure 4D and E](#)). Regarding to inflammatory cells recruited to lung tissue, we also observed a diminished neutrophils migration into the lung parenchyma in ethanol-treated mice, by MPO measurement, at 24 hr after infection ([Figure 4F](#)). Similar to alveoli, eosinophils and macrophages in pulmonary tissue exhibited no differences after *A. fumigatus* infection ([Figure 4G and H](#)). In addition, both ethanol-treated and control groups exhibited similar number of leukocytes in blood ([Figure 4I](#)). Besides, we characterized the populations of lymphocyte migrating to the airways of infected mice. We assessed CD3⁺CD4⁺IL17⁺ cells and results demonstrate that chronic ethanol consumption strongly reduced lymphocytes and IL-17 production in the site of infection after 24 hr of infection ([Figure 4J–L](#)). These results indicate that chronic ethanol consumption mostly affected specifically neutrophils recruitment to airways after *A. fumigatus* infection.

Chronic ethanol consumption increased lung pathology after *A. fumigatus* infection

We assessed histopathology to determine the effect of ethanol consumption in pulmonary tissue after infection. Tissue sections of infected mice revealed a massive leukocyte recruitment into the lungs at 24 hr after infection, in which the inflammatory infiltrate covers a large part of the pulmonary parenchyma structure, including alveoli and perivascular regions that decreases after 48 hr of infection in the control group. The cellular infiltrate tissue remains more prominent after 48 hr of infection only in ethanol-fed mice ([Figure 5A](#)). Histopathology score results showed that both ethanol-treated and control groups had similar levels of inflammatory infiltrate, interstitial and alveolar edema and hemorrhage scores at 24 hr of infection. However, after 48 hr of infection, ethanol consumption showed a remaining cellular infiltrate, higher edema and hemorrhage, which increased the total pathology scores ([Figure 5B–D](#)).

Chronic ethanol consumption reduced leukocyte rolling, adhesion, and chemotaxis in mouse neutrophils

In order to investigate the transmigration process of neutrophils upon chemotaxis in vivo, we first performed an intravital microscopy to visualize migratory cells ([Figure 6—source data 1](#)) ([Figure 6-rich media videos](#)). Intracostal administration of LPS was not able to induce a strong increase in rolling and adherence of cells to post capillary venules in ethanol-fed group after 2 hr of stimulation, compared to stimulated control group ([Figure 6A–D](#)). In addition, to confirm the impaired migratory ability of neutrophils was caused by ethanol consumption in mice, we performed ex vivo chemotaxis assay towards CXCL2, with mouse bone marrow-derived neutrophils ([Figure 6E](#)). As we expected because of previously results showed in [Figure 4B](#), neutrophils from ethanol-treated mice had an impaired migration towards the chemokine stimuli compared to neutrophils from control non-treated mice ([Figure 6F](#)). Taken together, these results demonstrate that chronic ethanol ingestion can affect neutrophil rolling, adhesion and recruitment in different tissues.

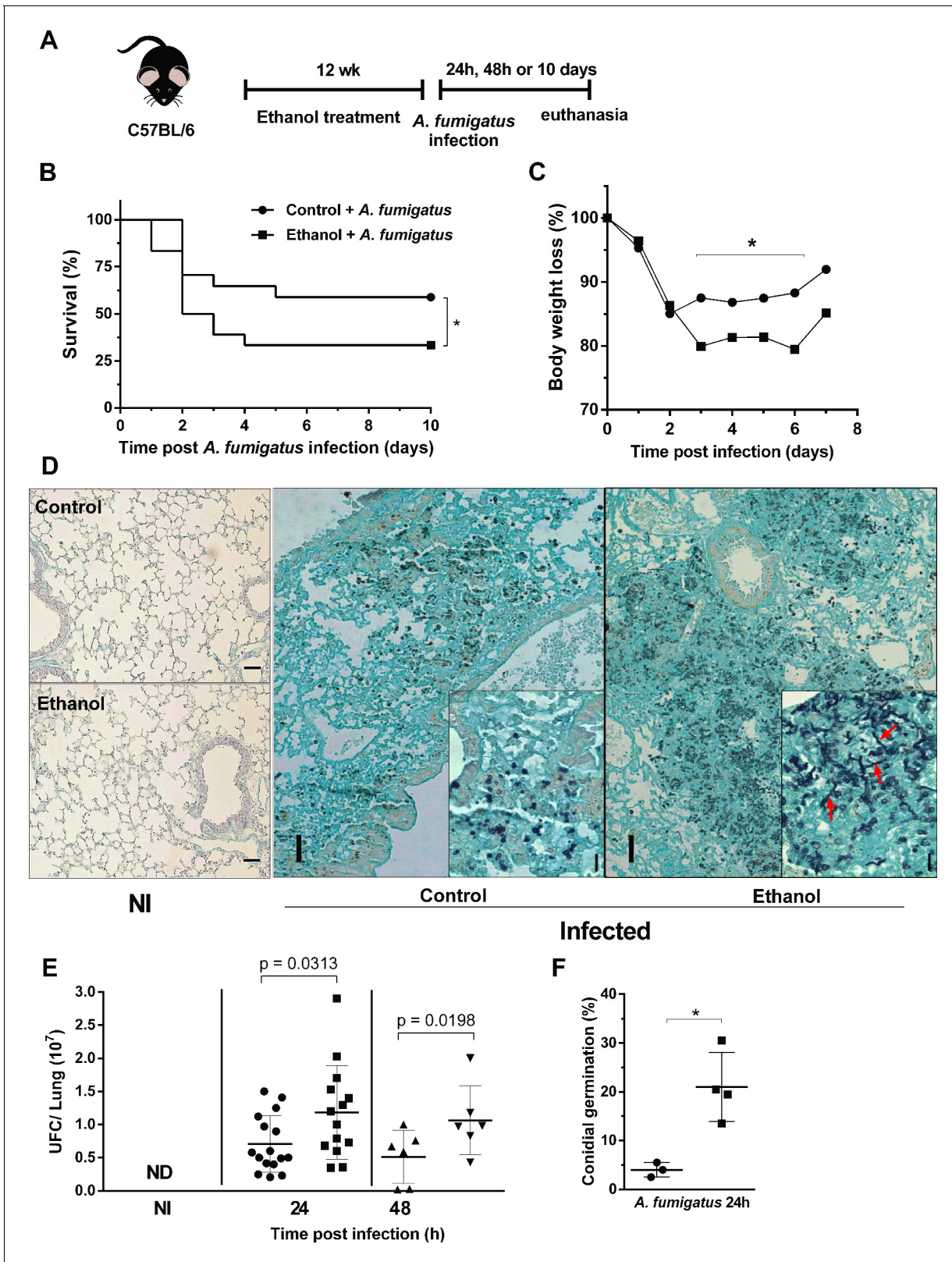


Figure 2. Chronic ethanol consumption leads to susceptibility associated with increased fungal load after *A. fumigatus* infection. (A) Experimental design: C57BL/6 mice were treated for 12 weeks with ethanol. The next day after the end of the treatment, mice were intranasally infected with 3×10^8 conidia of *A. fumigatus*. (B) Comparative lethality curves with $P = <0.0001$ in Log-rank (Mantel-Cox) test. (C) Comparative weight change curves of ethanol-fed group and control group were performed (18 mice per group). Right lungs were collected 24 and 48 hr after the infection. Homogenate
 Figure 2 continued on next page

Figure 2 continued

from right lungs were plated and CFUs were quantified. Left lungs were fixed with formaldehyde 4% and embedded in paraffin. Sections were stained with GMS and the percentage of germings was counted (6–16 mice per group) P value indicated in the figure in t test. (D) Representative slides of GMS staining. The insets in 24 hr images represent magnification to show germings (red arrows) into lung tissue. (E) Fungal load and (F) fungal germination in lungs $p=0.0389$ in t test. Bars represent 100 μm .

Chronic ethanol consumption impairs neutrophil's activation and recruitment by modulation of CD11b, CD62L and down regulation of CXCR2 in these cells during *A. fumigatus* infection

Neutrophils chemotaxis and recruitment is a complex process that requires leukocyte-endothelial interactions as well as inflammatory mediators' release (Kolaczowska and Kubek, 2013). Moreover, the main regulator of neutrophil migration in acute inflammation is CXCR2. To further investigate whether the impaired neutrophil migration is due a deficient neutrophil activation status during infection, we accessed the expression of the markers CD11b, CD62L and CXCR2 in circulating

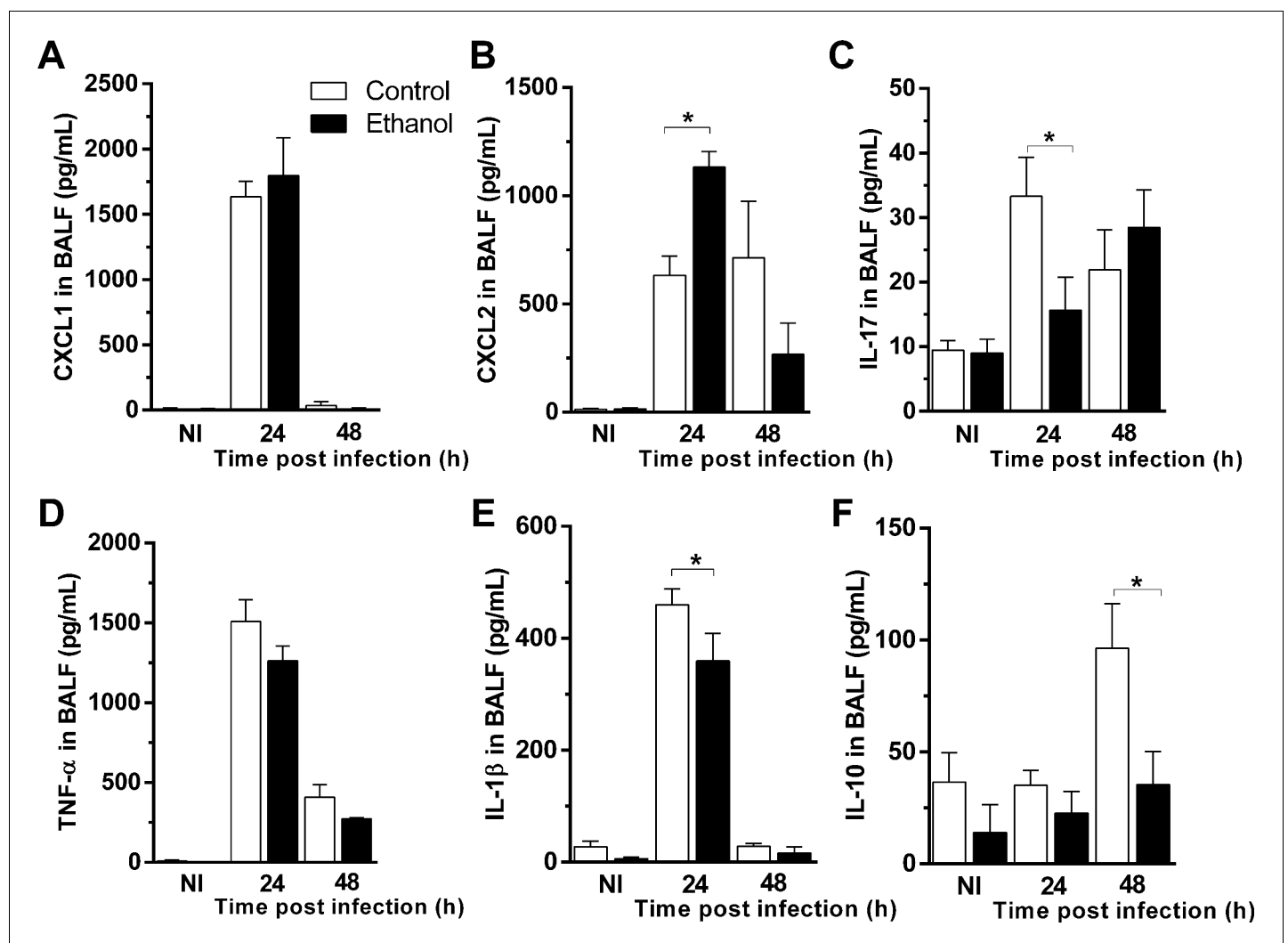


Figure 3. Ethanol consumption altered cytokine release in airways in mice after *A. fumigatus* infection. BALF supernatants were harvested at 24 and 48 hr after infection and used for ELISA assay. (A) CXCL1, (B) CXCL2, (C) IL-17, (D) TNF, (E) IL-1 β and (F) IL-10 levels in BALF. Experiments were assayed in triplicate. Data are presented as Mean \pm SD (3 to 9 mice per group). * $p<0.0247$ in ANOVA test. Please, also see [Figure 3—source data 1](#).

The online version of this article includes the following source data for figure 3:

Source data 1. Values for inflammatory mediators in BALF after *A. fumigatus* infection.

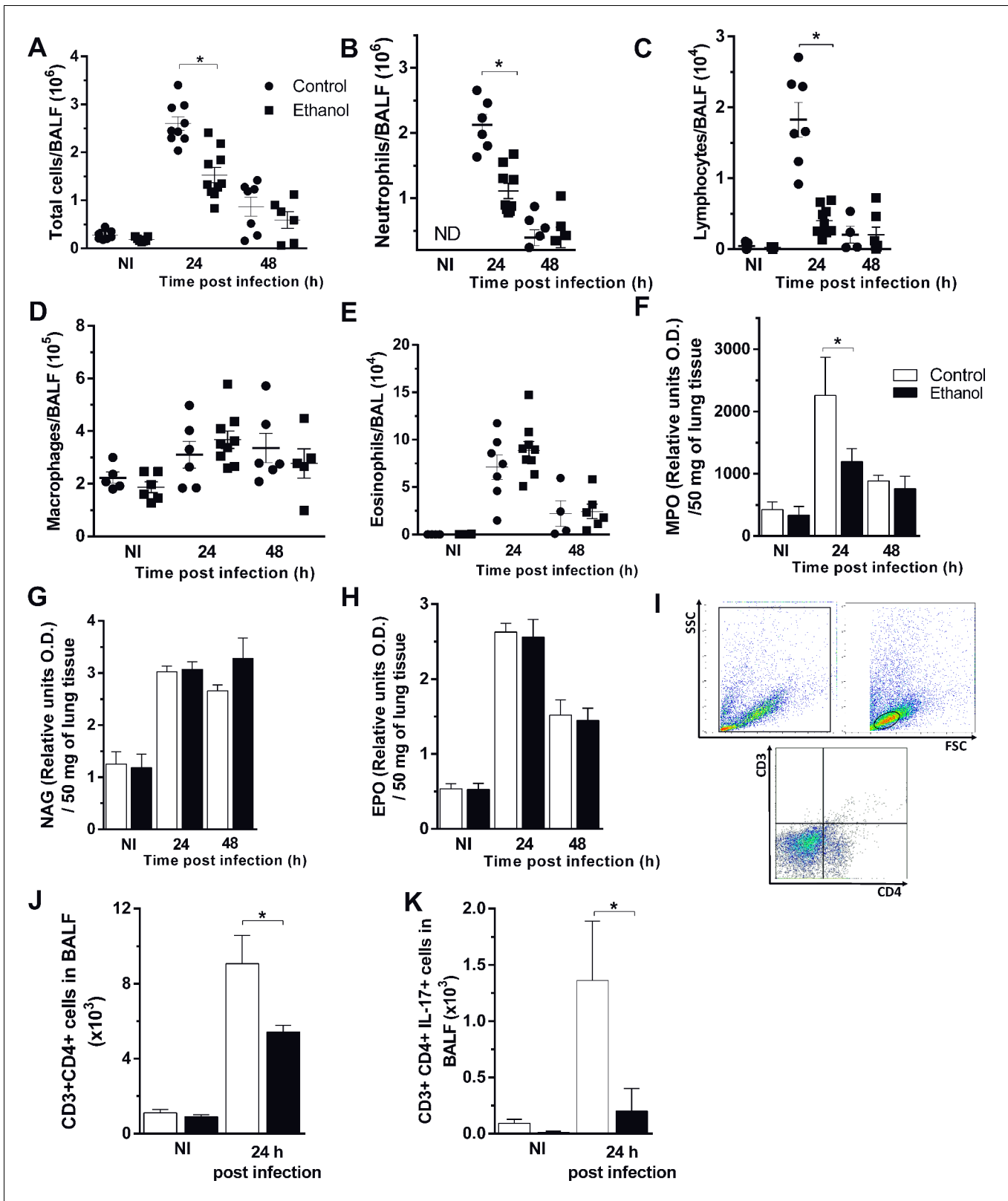


Figure 4. Chronic ethanol consumption affects cellular influx after *A. fumigatus* infection. After ethanol treatment, mice were infected with *A. fumigatus*. BALF and lungs were harvested at 24 and 48 hr after infection for inflammatory cell infiltrates determination. (A) Total cells, (B) Neutrophil, (C) Macrophage, (D) Lymphocyte, (E) Eosinophil counts in BALF. (F) MPO, (G) NAG and (H) EPO assays in lungs. (I) Blood leukocyte count/mL. BALF cells were labeled with specific antibodies for flow cytometry. (J) Gate strategy for CD3+CD4+ T cells. (K) CD3+CD4+ cells and (L) CD3+CD4+IL-17+ cells in Figure 4 continued on next page

Figure 4 continued

BALF. Experiments were assayed in triplicate. Data are presented as mean \pm SD (4 to 7 mice per group). *Significantly different ($p < 0.01$) in ANOVA test. Please, also see **Figure 4—source data 1**.

The online version of this article includes the following source data for figure 4:

Source data 1. Values for indirect measurement of cell infiltration in lung tissue and CD3+CD4+IL-17 cells in BALF after *A. fumigatus* infection.

neutrophils after *A. fumigatus* infection using flow cytometry. While CD11b is mobilized from specific granules to the cell surface, enzymatic shedding in activated polymorphonuclear (PMN) rapidly down regulates CD62L. Both markers have their constitutive expression in resting PMNs. We found that neutrophils activation status was compromised, with CD62L up regulation and CD11b down regulation, in the peripheral blood neutrophils of infected ethanol-treated mice compared to infected non-treated mice (**Figure 7A–C**). In sepsis, the reduction of neutrophils migration is related to the down regulation of CXCR2 protein expression on circulating neutrophils surface (**Alves-Filho et al., 2009**). Indeed, CXCL1 serum levels were strongly augmented in ethanol-treated mice compared to the control group at 24 hr post infection (**Figure 7D**). We next analyzed the role of chronic ethanol intake in regulating CXCR2 expression in circulating neutrophils. At 24 hr after *A. fumigatus* infection, ethanol-treated mice exhibited significantly fewer circulating neutrophils expressing CXCR2 in the surface compared to the non-treated group (**Figure 7E and F**).

Ethanol consumption decreases neutrophil functions of phagocytosis, killing and oxidative burst after *A. fumigatus* challenge

For the proper killing of *A. fumigatus*, fungal phagocytosis and ROS production by neutrophils are key events (**Philippe et al., 2003**). In this sense, we accessed phagocytosis and killing of *A. fumigatus* conidia by bone marrow-derived neutrophils from ethanol-treated and non-treated mice. We found that phagocytosis was significantly reduced in ethanol-treated mice either in vivo, evaluated by BALF recruited cells, or ex vivo, in bone marrow neutrophils, compared to control group (**Figure 8A and B**). Fungal killing was also reduced in ethanol intake mouse neutrophils (**Figure 8C**). Moreover, to evaluate the effect of chronic ethanol consumption in the promotion of respiratory burst of bone marrow-derived neutrophils we performed chemiluminescence experiments using luminol, which served as a probe for superoxide ($O_2^{\cdot-}$)⁴⁹. We observed that neutrophils from ethanol-fed mice produced lower levels of ROS triggered by *A. fumigatus* conidia compared to neutrophils from non-treated mice (**Figure 8D**). These results suggest that phagocytosis, killing and ROS production functions in neutrophils were affected by chronic ethanol consumption.

Discussion

For several centuries, chronic ethanol consumption has been associated to increased susceptibility to infections as well as increased morbidity and mortality after injury (**Lieber, 2005; Molina et al., 2010**). Numerous studies have shown the effects of acute or chronic exposure to ethanol in inflammatory infections such as in models of *K. pneumoniae* infection and gut bacteria-associated sepsis (**Ohama et al., 2015**), intravenous *Escherichia coli* challenge (**Bagby et al., 1998**), *S. pneumoniae* (**Trevejo-Nunez et al., 2015; Boé et al., 2001**) and a few studies reporting this effect in *Aspergillus* infection (**Blum et al., 1978**).

In the present study, we demonstrate how chronic ethanol consumption alters immune and inflammatory pulmonary response after *A. fumigatus* infection. This involves several immunological phenomena, including defective leukocytes rolling and adhesion, impaired neutrophil migration by down regulation of CXCR2, failed neutrophil activation, impaired neutrophil effector functions (phagocytosis and killing), and reduction of polarized-Th17 innate response. Those features are responsible for an increased susceptibility of mice to *A. fumigatus* infection.

Chronic ethanol consumption did not alter the basal levels of inflammatory cytokines and chemokines before infection. Ethanol ingestion had an important role in modulating immune response after infection, which is in accordance with previous findings (**D'Souza El-Guindy et al., 2007; Bhatti et al., 2011**). Ethanol consumption also alters IL-6 and TNF expression of LPS-stimulated Kupffer cells (**Maraslioglu et al., 2014**). In the present work, we found reduction in IL-1 β and IL-17 production after *A. fumigatus* infection in ethanol-fed mice, suggesting that the immunomodulatory

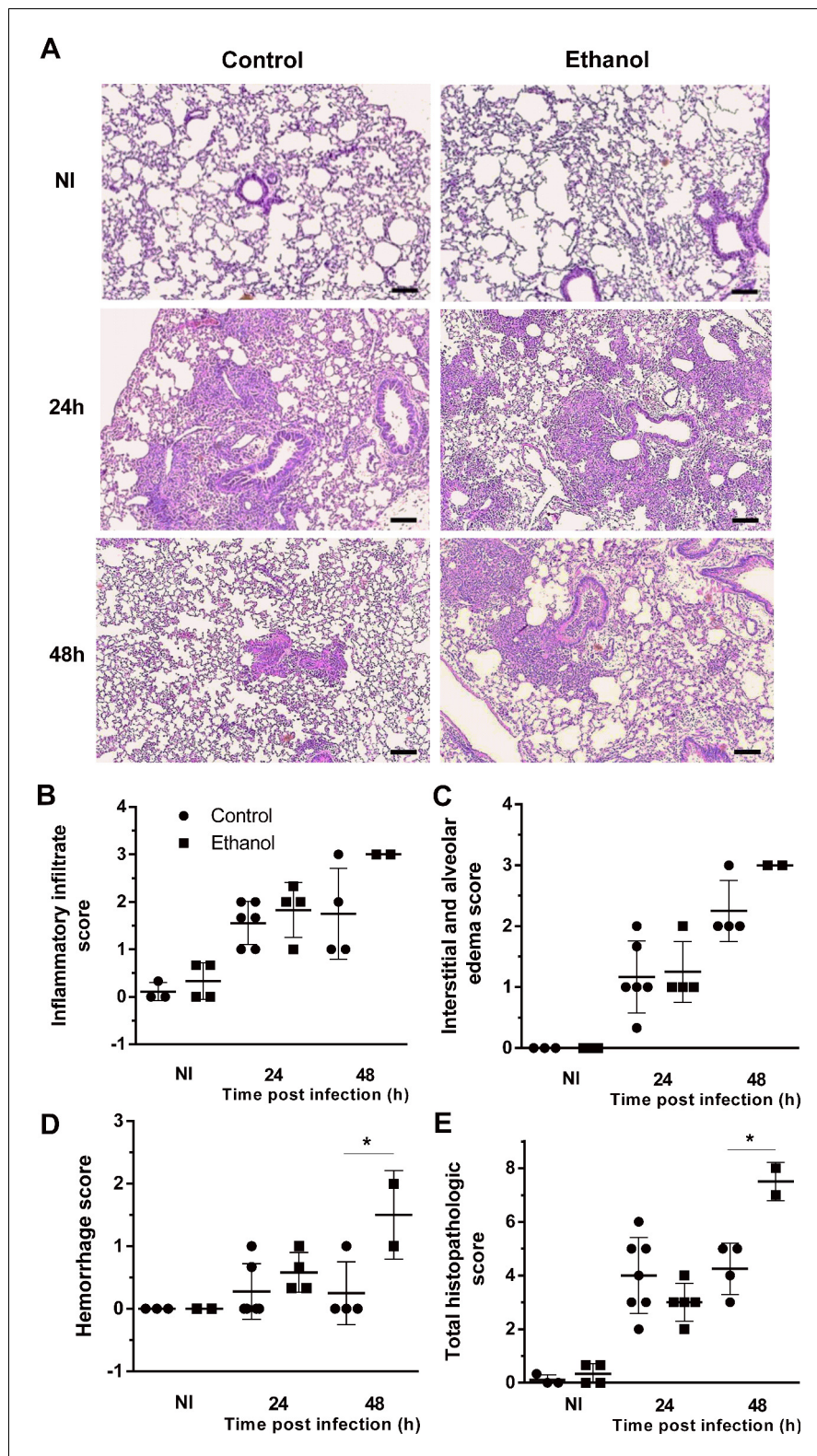


Figure 5. Lung histopathology is affected by ethanol treatment in mice. Lungs were harvested at 24 and 48 hr after infection fixed with formaldehyde 4% and embedded in paraffin. (A) Sections were stained with Hematoxylin and Eosin. Samples were graded on a 0 to 5-point scale score for (B) inflammatory infiltrate, (C) interstitial and alveolar edema, (D) hemorrhage and (E) total histopathologic score. Experiments were assayed in triplicate. Data are presented as mean ± SD (with 2 to 6 mice per group). * $p < 0.0142$ in ANOVA test. Bars represent 100 μ m.

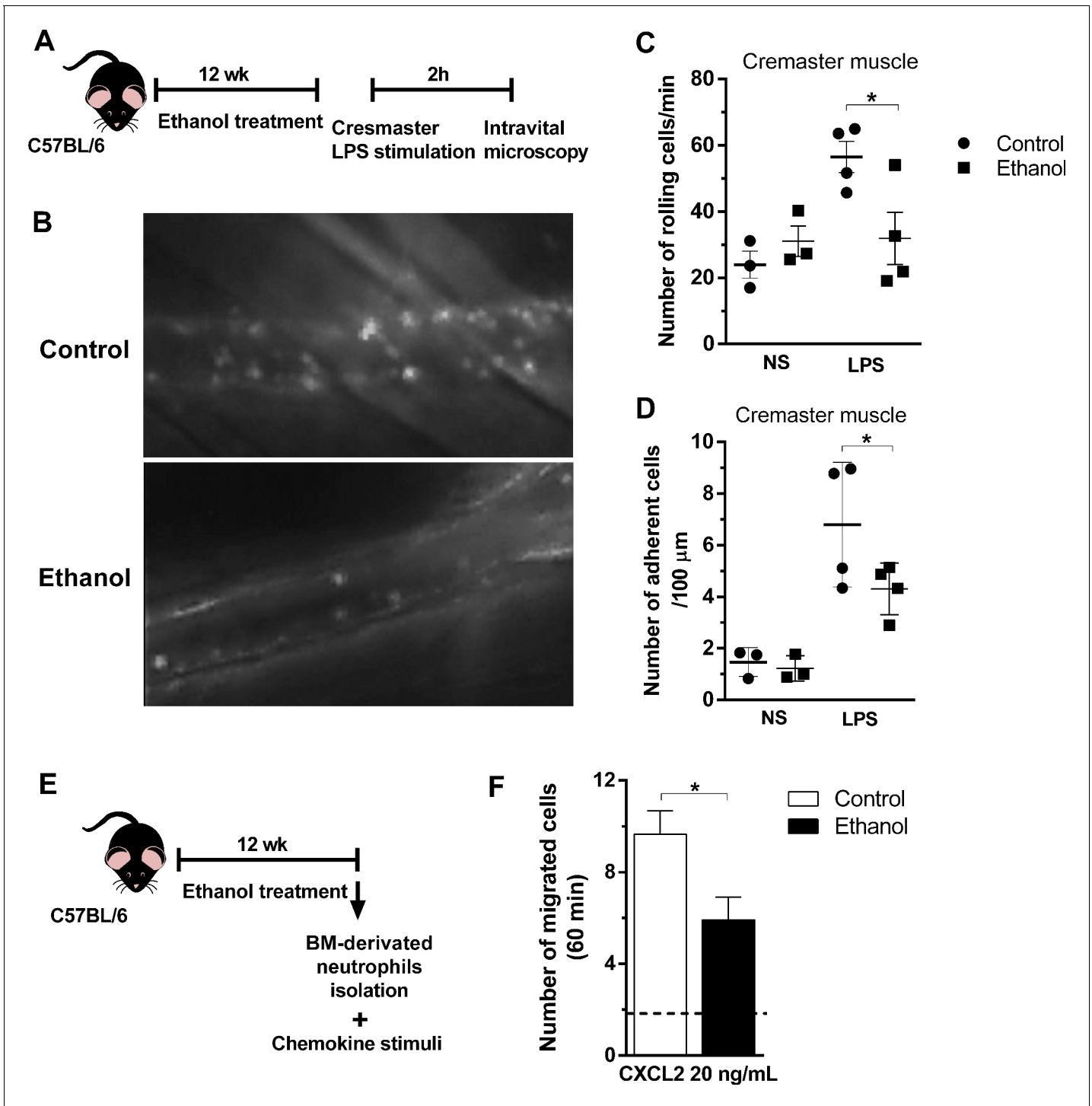


Figure 6. Chronic ethanol consumption reduced leukocyte rolling and adhesion in vivo and neutrophils chemotaxis ex vivo. (A) Experimental design: after the chronic ethanol treatment, mice received an intracrotal injection of LPS. After 2 hr, mice cremaster from mouse was exposed to examine the microcirculation by intravital microscopy. Post capillaries venules were recorded. (B) Representative images from the recorded videos (please see the rich media). (C) Number of rolling cells and (D) Number of adherent cells were counted in the videos. (E) Ex vivo neutrophil chemotaxis. Experimental design: after ethanol treatment, BM-derived neutrophils were separated by density gradient and a chemotaxis assay in a Boyden chamber towards CXCL2 was performed. (F) Number of migrated neutrophils in 60 min. Data are presented as Mean \pm SD (3 to 5 mice per group) *Significantly different ($p < 0.0028$) in ANOVA test. Please, also see **Figure 6—source data 1** and Figure 6-rich media videos. The online version of this article includes the following video and source data for figure 6:

Source data 1. Values for bone marrow neutrophil chemotaxis.

Figure 6 continued on next page

Figure 6 continued

Figure 6—video 1. Leukocyte rolling and adhesion *in vivo*-control mice + vehicle.

<https://elifesciences.org/articles/58855#fig6video1>

Figure 6—video 2. Leukocyte rolling and adhesion *in vivo*-ethanol-treated mice + vehicle.

<https://elifesciences.org/articles/58855#fig6video2>

Figure 6—video 3. Leukocyte rolling and adhesion *in vivo*-control mice + LPS.

<https://elifesciences.org/articles/58855#fig6video3>

Figure 6—video 4. Leukocyte rolling and adhesion *in vivo*- ethanol-treated mice + LPS.

<https://elifesciences.org/articles/58855#fig6video4>

effects caused by chronic ethanol consumption may contribute to the impaired inflammatory response against *A. fumigatus*.

It has been demonstrated that chronic ethanol consumption causes cellular abnormality in mice lung resident cells. Alveolar macrophages from ethanol-fed mice had deregulation in NADPH oxidase system, impairing phagocytosis and killing against *K. pneumoniae* (Yeligar *et al.*, 2012). In

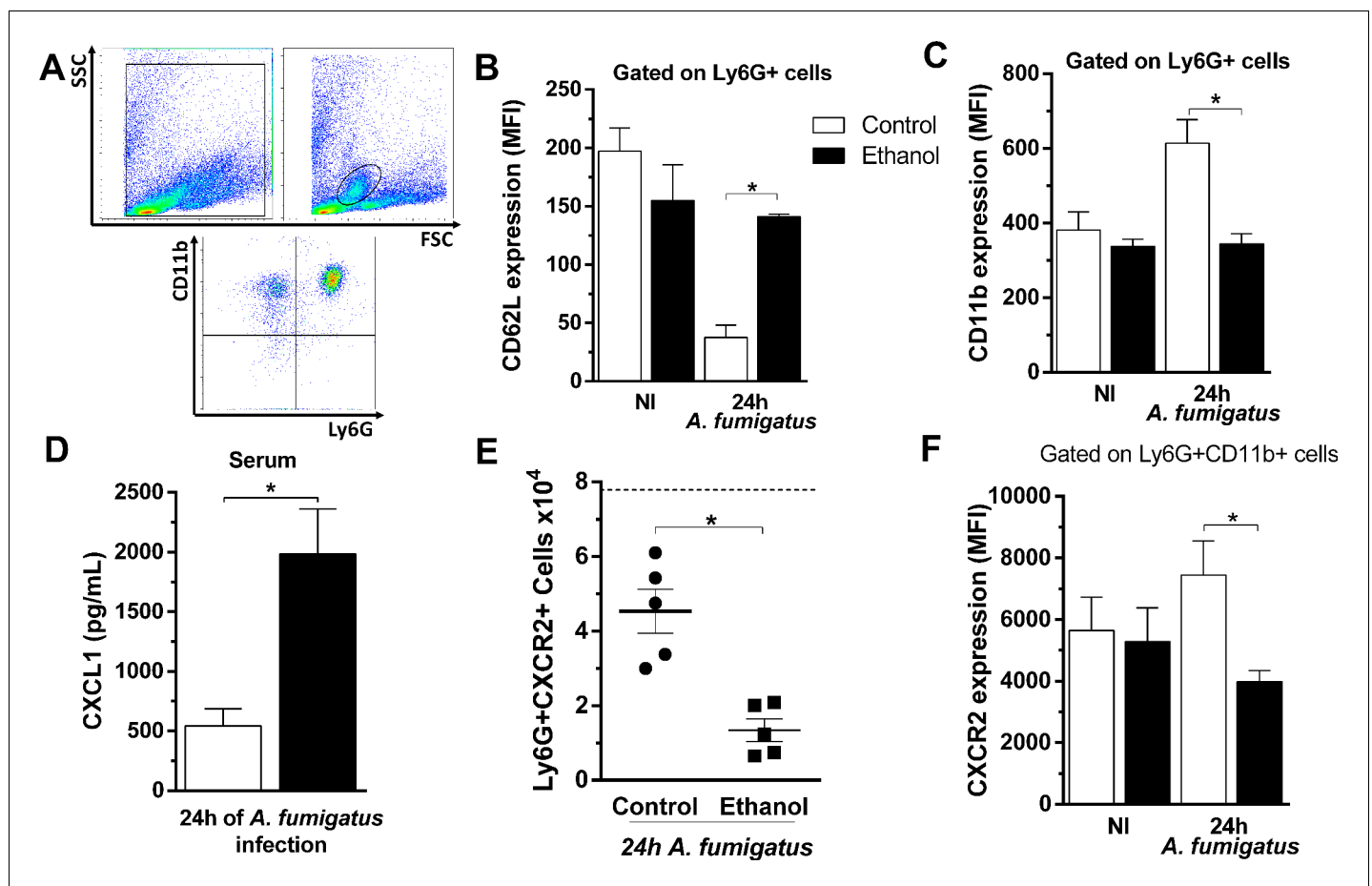


Figure 7. Chronic ethanol consumption impaired neutrophils activation and downregulated CXCR2 in a sepsis-like manner after *A. fumigatus* infection. After ethanol treatment and *A. fumigatus*, blood was harvested at 24 hr post infection. Neutrophils were labeled with specific antibodies for flow cytometry. (A) Gate strategy to analyze neutrophils. Neutrophils were gated by size and cellular complexity and then gated again as Ly6G⁺CD11b⁺ cells. (B) CD62L (*p=0.001) and (C) CD11b expression in circulating neutrophils (*p=0.0479). (D) Serum levels of CXCL1 were measured by ELISA assay after 24 hr of infection (*p = 0.0001). (E) Ly6G⁺CXCR2⁺ cells (*p=0.0489) and (F) MFI of CXCR2 expression in blood (*p=0.007). Experiments were done at least twice. Data are presented as mean ± SD (3 to 8 mice per group). Analysis were made by ANOVA test. Dashed line represents basal levels of non-infected groups. Please, also see **Figure 7—source data 1**.

The online version of this article includes the following source data for figure 7:

Source data 1. Values of flow cytometry data.

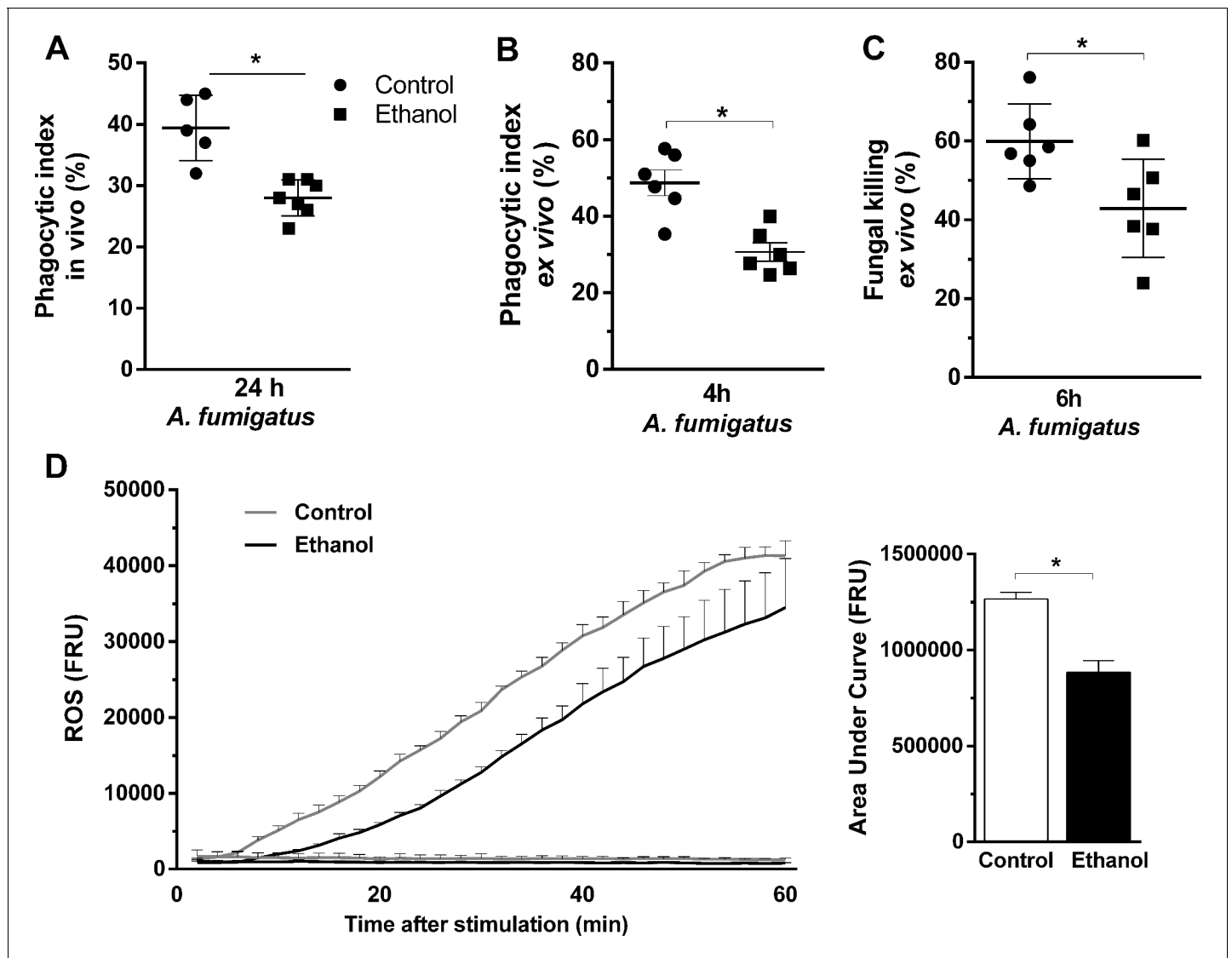


Figure 8. Ethanol consumption decreased neutrophils phagocytosis, killing and ROS production after *A. fumigatus* stimuli. (A) Conidial phagocytosis was determined in BALF (* $p=0.007$). (B–D) After ethanol treatment, BM-derived neutrophils were separated by density gradient and incubated with *A. fumigatus* conidia. (B) Ex vivo phagocytosis was assessed by cytospin preparations from BALFs (* $p=0.0013$). (C) Killing assay was evaluated by cell lysis with water, the diluted samples were plated in fungal medium and colony-forming units (CFU) were determined after overnight incubation (* $p=0.0238$). (D) Luminometry assay was performed to evaluate neutrophil-mediated ROS production and area under curve analysis. (* $p=0.057$). Data are presented as mean \pm SD (3 to 6 mice per group). Analysis were made by t student test.

fact, an impaired NADPH oxidase activity is a well-known risk factor to develop invasive aspergillosis and other life threatening diseases, as seen in Chronic Granulomatous Disease (CGD) patients (Cohen et al., 1981; King et al., 2016; Segal and Romani, 2009). Another study showed both lymphocytes and neutrophils response impaired by ethanol consumption in a model of cutaneous infection by *Staphylococcus aureus*, in which chronic ethanol-fed mice showed great skin lesions and bacteremia associated with reduced IL-17 and IL-1 β production, suggesting that Th17-mediated neutrophilic response was impaired (Parlet et al., 2015).

Neutrophil recruitment to the site of infection is essential for the control of invading extracellular pathogens (Kolaczkowska and Kubes, 2013; Sun et al., 2014; Rios-Santos et al., 2007). Neutrophils are major cell type recruited for *A. fumigatus* conidia and hyphae killing and neutropenic patients are more susceptible to systemic fungal infections (Dagenais and Keller, 2009; Gazendam et al., 2016). In our data, neutrophil recruitment to infection site, in ethanol-fed mice,

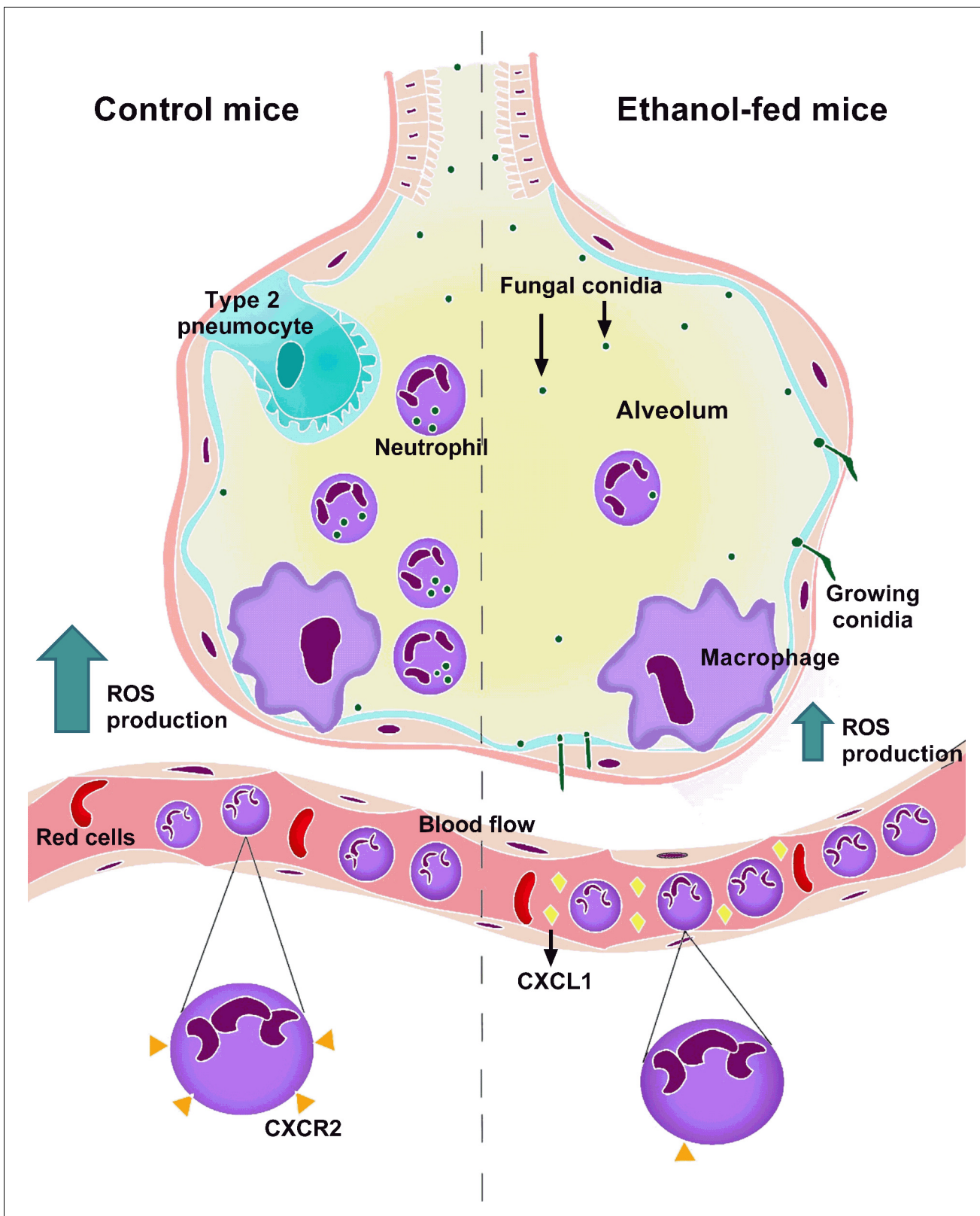


Figure 9. Mechanism related to chronic ethanol dysfunction in neutrophils after *A. fumigatus* infection. In normal conditions, infection with *A. fumigatus* in mice causes a huge inflammatory response, characterized by neutrophil chemokines release. The recruited neutrophils clear the infection by phagocytosis and ROS-mediated killing. In contrast, in a condition of chronic ethanol consumption, despite the correct induction of inflammatory

Figure 9 continued on next page

Figure 9 continued

response, there is an increase of CXCR2 ligands in blood flow, causing CXCR2 downregulation. This leads to lower neutrophils recruitment, culminating in substantial fungal burden into the lungs from ethanol-fed mice.

was impaired even though we did not observe decrease in both CXCL1 and CXCL2 BALF levels, indicating that ethanol consumption is responsible for compromising neutrophils activation and migration. Moreover, our data showed reduced leukocyte rolling and adhesion after LPS stimuli in ethanol-treated mice outside the airways. CXCL1 and CXCL2 chemokines bind to CXCR2 displaying an essential role in neutrophils activation and ensuing adhesion to endothelium (Kolaczowska and Kubes, 2013; Phillipson and Kubes, 2011). In fact, it was demonstrated in vitro that chronic ethanol exposure impacted tight junction structures in epithelial cells, leading them vulnerable to endotoxemia (Wood et al., 2013). However, in our study vascular permeability was similar in both ethanol-fed mice and control mice groups (data not shown).

It has been well established that the decrease of CXCR2 expression impairs neutrophil migration (Russo et al., 2009), especially in sepsis (Rios-Santos et al., 2007; Alves-Filho et al., 2009), in which a great amount of inflammatory cytokines and chemokines is released to the blood, causing a complex systemic inflammation (Pierrakos and Vincent, 2010). In a model of severe sepsis, it was found that the migration failure and consequent mortality of individual was associated with the diminished expression of neutrophils CXCR2, which was due to great release of systemic CXCL1 (39). As seen in sepsis, our findings showed decrease CXCR2 expression and great amount of systemic CXCL1 levels in serum of ethanol-fed mice after *A. fumigatus* infection. To our knowledge, this is the first report establishing a relation between chronic ethanol intake and downregulation of CXCR2 receptor in mouse neutrophils. It is also important to mention that the cooperation between the GPCR receptor CXCR2 and P-selectin ligand, the P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) is essential to a successful neutrophil migration. The signaling events that ensure the adhesion cascade include the conversion of integrin $\alpha\beta2$ from a low-affinity conformation to an extended high-affinity conformation that causes arrest and, consequently, perivascular crawling (Yago et al., 2018). Further studies are needed to address the role of chronic ethanol consumption in expression of P-selectin and PSGL-1. Our data indicate that chronic ethanol consumption drives host to a sepsis-like phenotype and this mechanism is responsible for impaired neutrophil migration. The mechanisms whereby CXCR2 is downregulated need further investigation.

To conclude, the findings presented here indicate a new paradigm in how chronic ethanol consumption strongly impairs neutrophils host pulmonary defense against *A. fumigatus* infection. This infection in mice causes a great inflammatory response, with release of cytokines and chemokines that act in favor to recruit neutrophils into the alveoli and these neutrophils are able to clear the fungus. In contrast, in a condition of chronic ethanol consumption, despite the correct induction of inflammatory response, neutrophils exhibit failure in activation, through the down regulation of CD11b and up regulation of CD62L in blood neutrophils and by accentuated release of CXCR2 ligands in blood flow. This leads to CXCR2 down regulation, which culminated in impaired neutrophils recruitment, increased fungal load and exacerbated lung pathology in mice. We also associate the lower neutrophils levels into the airways with lower innate polarized-Th17 immune response and reduced phagocytosis and killing of *A. fumigatus* conidia. In fact, we observed growing conidia and substantial fungal burden in lung from ethanol-fed mice, contributing to the highest susceptibility of ethanol-treated mice to *A. fumigatus* infection (Figure 9).

Materials and methods

Key resources table

Reagent type (species) or resource	Designation	Source or reference	Identifiers	Additional information
------------------------------------	-------------	---------------------	-------------	------------------------

Continued on next page

Continued

Reagent type (species) or resource	Designation	Source or reference	Identifiers	Additional information
Strain, strain background (<i>Mus musculus</i>)	C57BL/6J	Multidisciplinary center for Biological Investigation on Laboratory Animal Science (CEMIB) -Unicamp	C57BL/6JUnib	
Genetic reagent (<i>Aspergillus fumigatus</i>)	Strain A1163	<i>A. fumigatus</i> CEA17 isolate (CEA10 derivative) and converted to pyrG+ via <i>A. niger</i> pyrG gene ectopic insertion Fedorova et al., 2008; Malacco et al., 2019.		
Cell line (<i>M. musculus</i>)	Primary bone marrow neutrophils	This paper	C57BL/6JUnib	Freshly isolated from C57BL/6J (<i>M. musculus</i>)
Peptide, recombinant protein	Recombinant murine MIP-2 (CXCL2)	PeproTech	Cat# 250-15	Chemotaxis (20 ng/ml)
Antibody	Purified NA/LE CD16/CD32 Clone 2.4G2 - FC Block (Rat monoclonal)	BD Biosciences	Cat# 553140	FACS (1:100)
Antibody	anti-CD3-FITC (Rat monoclonal)	BD Biosciences	Cat# 555274	FACS (1:100)
Antibody	anti-CD4-APC (Rat monoclonal)	BD Biosciences	Cat# 553051	FACS (1:200)
Antibody	anti-IL-17a-PE (Rat monoclonal)	BD Biosciences	Cat# 559502	FACS (1:100)
Antibody	anti-Ly6G-BV421 (Rat monoclonal)	BD Biosciences	Cat# 562737	FACS (1:50)
Antibody	anti-CXCR2-PE (Rat monoclonal)	R and D Systems	Cat# FAB2164P	FACS (1:10)
Antibody	anti-CD62L-APC (Rat monoclonal)	BD Biosciences	Cat# 553152	FACS (1:100)
Antibody	anti-CD11b-FITC (Rat monoclonal)	BD Biosciences	Cat# 553310	FACS (1:100)
Commercial assay or kit	Mouse TNF-a ELISA kit	R and D Systems	Cat# DY410	
Commercial assay or kit	Mouse IL-1b ELISA kit	R and D Systems	Cat# DY401	
Commercial assay or kit	Mouse CXCL1 ELISA kit	R and D Systems	Cat# DY453	
Commercial assay or kit	Mouse CXCL2 ELISA kit	R and D Systems	Cat# DY452	
Commercial assay or kit	Mouse IL-17 ELISA kit	R and D Systems	Cat# DY421	
Commercial assay or kit	Mouse IL-10 ELISA kit	R and D Systems	Cat# DY417	
Software, algorithm	Prism	GraphPad		
Software, algorithm	FlowJo	BD		

Ethics statement and mouse model of chronic ethanol consumption

All animal experiments received prior approval from the Animal Ethics Committee (CEUA) of Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Brazil (Protocol number: 4/2015). Male C57BL/6J mice

were randomly allocated into experimental groups. Mice were maintained in specific pathogen-free conditions. The chronic ethanol consumption model used was previously described (*Ceron et al., 2018; Simplicio et al., 2017*). Briefly, mice received ethanol 5% (v/v) in the first week, followed by 10% (v/v) in the second week (to help mice acclimate with this intervention) and were treated during 10 weeks with 20% (v/v) of ethanol in their drinking water. Control group received water. This protocol replicates blood ethanol levels after chronic ethanol consumption in human subjects, as described in studies with C57BL/6J or BALB/c mice (*Ceron et al., 2018; Simplicio et al., 2017; Urso et al., 1981*). Weight change, food and liquid consumption were measured weekly during ethanol treatment.

Cytokine and chemokine measurement

Cytokine and chemokine levels (TNF- α , IL-1 β , CXCL1, CXCL2, IL-17, IL-10) were quantified in BAL, serum or plasma fluid using DuoSet ELISA kits (R and D Systems), in accordance to the manufacturer's instructions.

Determination of blood ethanol levels

The determination of blood ethanol levels was made as previously described (*Gonzaga et al., 2015*). Briefly, mice were anesthetized and 100 μ L of blood was collected and transferred into head-space vials. Blood ethanol levels were measured by gas chromatograph using a gas chromatograph as previously described (*Ceron et al., 2018*).

Mice infection

To determine the impact of chronic alcohol intake in fungal pulmonary infection, male C57BL/6J mice were treated for 12 weeks. After the last day of treatment, mice were infected intranasally with *Aspergillus fumigatus* A1163 strain (*Fedorova et al., 2008*). The fungus was grown in complete media for 48 hr at 37°C (*Malacco et al., 2019*). Fungal conidia were harvested by washing the media with sterile phosphate-buffered saline (PBS). After filtering, conidia were centrifuged at 1400 \times g resuspended and counted in Neubauer chamber. Mice were infected with 3×10^8 conidia/animal, prepared in PBS.

BAL and tissue extraction

After 24 or 48 hr of infection, mice were anesthetized with ketamine (100 mg/kg) and xilazine (6 mg/Kg) and blood smear and serum or plasma were collected. After that, mice were euthanized and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was harvested as previously described (*Malacco et al., 2019*). BALF total cell counts were determined by counting leukocytes in Neubauer chamber. Differential cell count and in vivo phagocytosis count were obtained from cytopspin preparations (Shandon III). BALF supernatants were used for cytokines, chemokines and total protein measurements. Protein amounts were quantified in BALF samples using the Bradford assay (*Bradford, 1976*).

Lung pathology analysis

At the indicated time points, lungs were collected. The right lobes were removed and frozen for subsequent analysis of myeloperoxidase (MPO) (*Huang et al., 2016*), N-acetylglucosaminidase (NAG) (*Reiner et al., 1981*), eosinophil peroxidase (EPO) (*Strath et al., 1985*) or measurement of fungal burden. The left lobes were fixed in formalin 4% (v/v) for histopathological analysis. Formalin-fixed tissue was dehydrated gradually in ethanol, embedded in paraffin, and 4 μ m sections were stained with Hematoxylin and Eosin (H and E) or Grocott's methenamine silver (GMS). The total histopathology score considered inflammatory infiltrate, interstitial and alveolar edema and hemorrhage (*Hubbs et al., 1997*). The percentage of germination of *A. fumigatus* conidia was counted in 200 to 300 fungal conidia in GMS-stained slides at \times 100 magnification microscope.

Flow cytometry

Leukocytes obtained from BAL or blood samples were subjected to hypotonic lysis to remove residual erythrocytes, as described previously (*Russo et al., 2009*). Briefly, cells were treated with Fc block (R and D Systems), labeled with relevant antibodies, namely: CD3 - fluorescein isothiocyanate (FITC), CD4 - APC, IL-17 - phycoerythrin (PE), Ly6G - brilliant violet 421 (BV421), CXCR2 - PE, CD62L

– APC and CD11b – FITC or isotype control. At least 30,000 events were acquired in a FACScan cytometer, and data were analyzed using FlowJo (Tree Star, Ashland, OR, USA) software. The relevant populations were gated, using accepted criteria for granularity, and sized and evaluated for staining of relevant surface and intracellular markers.

Intravital microscopy

The mouse cremaster preparation was used to study the behavior of leukocytes in the microcirculation and adjacent connective tissue, as previously described (Pinho *et al.*, 2007). Briefly, 2 hr prior the surgery, mouse cremaster muscle were injected with LPS (250 ng/mL) diluted in saline. Then an incision was made in the scrotal skin to expose the cremaster muscle, which was then carefully removed from the associated fascia. A lengthwise incision was made on the ventral surface of the cremaster muscle using a cautery. The testicle and the epididymis were separated from the underlying muscle and were moved into the abdominal cavity. The muscle was then spread out over an optically clear viewing pedestal and was secured along the edges with a 4–0 suture. The exposed tissue was superfused with warm PBS. An intravital microscope (Olympus BX50F4) with x 20 magnification objective lens and x 10 times magnification eyepiece was used to examine the cremasteric microcirculation. A video camera (5100 HS; Panasonic) was used to project the images onto a monitor, and the images were recorded for playback analysis. The numbers of rolling and adherent leukocytes were determined offline during the video playback analyses. Leukocytes were considered adherent to the venular endothelium if they remained stationary for at least 30 s. Rolling leukocytes were defined as white cells moving at a velocity slower than that of the erythrocytes within a given vessel.

BM-derived neutrophils, phagocytosis and killing of fungal conidia

After isolation of mouse bone marrow (BM) from femur and tibia in RPMI 1640 medium, neutrophils were separated by density gradient centrifugation using Histopaque 1077 (density, 1.077 g/ml) in a 15 ml conical tube. Then, erythrocytes were lysed using ACK lysing buffer and the neutrophils were counted. Neutrophils purity was over than 80% (Swamydas and Lionakis, 2013). Phagocytosis and killing assay were performed by incubation of BM-derived neutrophils from mice treated and non-treated with ethanol with *A. fumigatus* conidia for 4 hr (phagocytosis) or 6 hr (killing) at 37° with 5% of CO₂ in the ratio of 5:1. Phagocytosis was evaluated in cyospin preparations. To determine *A. fumigatus* killing, cells were lysed with distilled water and the diluted samples were plated in fungal medium and colony-forming units (CFU) were determined after overnight incubation at 37°C, and the percentage of killing was calculated as a percentage of the viability after incubation without neutrophils.

ROS detection

Luminometry assays were performed to evaluate the production of ROS by BM-derived neutrophils (Goes *et al.*, 2016). Neutrophils (1×10^6 cells/well) were resuspended in complete RPMI medium without phenol red. Then the cells were plated in 96 well opaque plates (NUNC, Rochester, NY, USA) with 0.05 mM luminol (5-Amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione; Sigma-Aldrich) and *A. fumigatus* conidia in the proportion of 10 conidia to one neutrophil. Measurements were taken for 60 min with 2 min interval. Production of ROS was assayed by the light intensity generated by the reaction between ROS and luminol and expressed as fluorescent relative units.

Ex vivo chemotaxis assay

A modified Boyden chamber assay to examine the neutrophil chemoattractant response to CXCL-2 (kindly provided by Dr. José Carlos Alves-Filho, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil) was performed using a 48-well microchamber (Neuro Probe) as previously described (Pinho *et al.*, 2007). Murine bone marrow neutrophils were isolated as above described and resuspended in RPMI. Recombinant mouse CXCL-2 (20 ng/mL) diluted in running buffer (for wells containing neutrophils) or appropriate buffer control was added to the lower chambers of the apparatus. A 5- μ m-pore polycarbonate membrane (Neuro Probe) was placed between the upper and lower chambers, and 5×10^4 cells in a volume of 50 μ L were added to the top chambers of the apparatus. Cells were allowed to migrate into the membrane for 1 hr per treatment at 37°C with 5% CO₂. Following

incubation, the chamber was disassembled and the membrane was scraped and washed three times in PBS to remove nonadherent cells before being fixed in methanol and stained using the Diff-Quik system (Dade Behring). Each well-associated membrane area was scored using light microscopy to count the intact cells present in five random fields.

Statistical analysis

All experiments were made at least twice (biological replication) by independent experiments. The sample size estimation was done with G*Power 3.1 Software (Jacob Cohen's A power primer, 1992 in Psychological Bulletin Journal). Statistical analysis was performed with Graph Pad Prism six software (Graph Pad Prism Software, Inc, Sandiego, CA). Data are presented as the mean \pm SD and were analyzed using One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey post-test to compare different groups. Student's t test was used to compare two groups. Survival analysis was made by Log Rank test. Statistical significance was set as < 0.05 . For more information, please see the transparent reporting form.

Acknowledgements

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

Additional information

Funding

Funder	Grant reference number	Author
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais	APQ-01756-10	Jessica Amanda Marques Souza Leda Quercia Vieira Danielle Glória Souza Vanessa Pinho Mauro Martins Teixeira Frederico Marianetti Soriani
Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior	001	Nathalia Luisa Sousa de Oliveira Malacco Jessica Amanda Marques Souza
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico	474528-2012- 0 and 483184-2011-0	Frederico Marianetti Soriani
Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Dengue e Interações Microrganismo-Hospedeiro		Nathalia Luisa Sousa de Oliveira Malacco Jessica Amanda Marques Souza Flavia Rayssa Braga Martins Leda Quercia Vieira Danielle Glória Souza Vanessa Pinho Mauro Martins Teixeira Frederico Marianetti Soriani
Universidade Federal de Minas Gerais	001	Nathalia Luisa Sousa de Oliveira Malacco Jessica Amanda Marques Souza Flavia Rayssa Braga Martins Milene Alvarenga Rachid Celso Martins Queiroz-Junior Grazielle Ribeiro Goes Leda Quercia Vieira Danielle Glória Souza Vanessa Pinho Mauro Martins Teixeira Frederico Marianetti Soriani

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

APQ-02198-14 and APQ-03950-17

Jessica Amanda Marques Souza
Leda Quercia Vieira
Danielle Glória Souza
Vanessa Pinho
Mauro Martins Teixeira
Frederico Marianetti Soriani

The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

Author contributions

Nathalia Luisa Sousa de Oliveira Malacco, Investigation, Methodology, Writing - original draft; Jessica Amanda Marques Souza, Flavia Rayssa Braga Martins, Janaina Aparecida Simplicio, Celso Martins Queiroz-Junior, Grazielle Ribeiro Goes, Methodology; Milene Alvarenga Rachid, Carlos Renato Tirapelli, Vanessa Pinho, Resources, Methodology; Adriano de Paula Sabino, Formal analysis; Leda Quercia Vieira, Danielle Glória Souza, Resources; Mauro Martins Teixeira, Resources, Writing - review and editing; Frederico Marianetti Soriani, Conceptualization, Resources, Supervision, Funding acquisition, Project administration, Writing - review and editing

Author ORCIDs

Frederico Marianetti Soriani  <https://orcid.org/0000-0003-4720-6746>

Ethics

Animal experimentation: This study was performed in strict accordance with the recommendations of the CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal) from Brazil. All animal experiments received prior approval from the Animal Ethics Committee (CEUA) of Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Brazil (Protocol number: 4/2015).

Decision letter and Author response

Decision letter <https://doi.org/10.7554/eLife.58855.sa1>

Author response <https://doi.org/10.7554/eLife.58855.sa2>

Additional files

Supplementary files

- Supplementary file 1. Percentage of neutrophil precursors in bone marrow after ethanol treatment.

Data availability

All data generated or analysed during this study are included in the manuscript and supporting files.

References

- Alves-Filho JC, Freitas A, Souto FO, Spiller F, Paula-Neto H, Silva JS, Gazzinelli RT, Teixeira MM, Ferreira SH, Cunha FQ. 2009. Regulation of chemokine receptor by Toll-like receptor 2 is critical to neutrophil migration and resistance to polymicrobial Sepsis. *PNAS* **106**:4018–4023. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0900196106>, PMID: 19234125
- Baddley JW. 2011. Clinical risk factors for invasive aspergillosis. *Medical Mycology* **49**:S7–S12. DOI: <https://doi.org/10.3109/13693786.2010.505204>
- Bagby GJ, Zhang P, Stoltz DA, Nelson S. 1998. Suppression of the granulocyte colony-stimulating factor response to *Escherichia coli* challenge by alcohol intoxication. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* **22**:1740–1745. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.1998.tb03974.x>, PMID: 9835289
- Bautista AP. 1999. Impact of alcohol on the ability of kupffer cells to produce chemokines and its role in alcoholic liver disease. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* **2000**:349–356. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1440-1746.2000.02174.x>
- Bhatty M, Jan BL, Tan W, Pruett SB, Nanduri B. 2011. Role of acute ethanol exposure and TLR4 in early events of Sepsis in a mouse model. *Alcohol* **45**:795–803. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2011.07.003>, PMID: 21872420

- Blum J, Reed JC, Thompson WM, Pizzo S. 1978. Miliary aspergillosis. *Am J Roentgenol* **131**:707–709. DOI: <https://doi.org/10.2214/ajr.131.4.707>
- Boé DM, Nelson S, Zhang P, Bagby GJ. 2001. Acute ethanol intoxication suppresses lung chemokine production following infection with *Streptococcus pneumoniae*. *The Journal of Infectious Diseases* **184**:1134–1142. DOI: <https://doi.org/10.1086/323661>, PMID: 11598836
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**:248–254. DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3), PMID: 942051
- Brown GD, Denning DW, Gow NA, Levitz SM, Netea MG, White TC. 2012. Hidden killers: human fungal infections. *Science Translational Medicine* **4**:165rv13. DOI: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004404>, PMID: 23253612
- Caffrey-Carr AK, Kowalski CH, Beattie SR, Blaseg NA, Upshaw CR, Thammahong A, Lust HE, Tang Y-W, Hohl TM, Cramer RA, Obar JJ. 2017. Interleukin 1 α is critical for resistance against highly virulent *Aspergillus fumigatus* isolates. *Infection and Immunity* **85**:00661-17. DOI: <https://doi.org/10.1128/IAI.00661-17>
- Ceron CS, do Vale GT, Simplicio JA, Ricci ST, De Martinis BS, de Freitas A, Tirapelli CR. 2018. Chronic ethanol consumption increases vascular oxidative stress and the mortality induced by sub-lethal Sepsis: potential role of iNOS. *European Journal of Pharmacology* **825**:39–47. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.02.008>, PMID: 29438701
- Cohen MS, Isturiz RE, Malech HL, Root RK, Wilfert CM, Gutman L, Buckley RH. 1981. Fungal infection in chronic granulomatous disease the importance of the phagocyte in defense against fungi. *The American Journal of Medicine* **71**:59–66. DOI: [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(81\)90259-x](https://doi.org/10.1016/0002-9343(81)90259-x), PMID: 7195647
- D'Souza El-Guindy NB, de Villiers WJ, Doherty DE. 2007. Acute alcohol intake impairs lung inflammation by changing pro- and anti-inflammatory mediator balance. *Alcohol* **41**:335–345. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2007.07.002>, PMID: 17889310
- Dagenais TR, Keller NP. 2009. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in invasive aspergillosis. *Clinical Microbiology Reviews* **22**:447–465. DOI: <https://doi.org/10.1128/CMR.00055-08>, PMID: 19597008
- Erwig LP, Gow NAR. 2016. Interactions of fungal pathogens with phagocytes. *Nature Reviews Microbiology* **14**:163–176. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2015.21>
- Fedorova ND, Khaldi N, Joardar VS, Maiti R, Amedeo P, Anderson MJ, Crabtree J, Silva JC, Badger JH, Albarraq A, Angiuoli S, Bussey H, Bowyer P, Cotty PJ, Dyer PS, Egan A, Galens K, Fraser-Liggett CM, Haas BJ, Inman JM, et al. 2008. Genomic islands in the pathogenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *PLOS Genetics* **4**:e1000046. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000046>, PMID: 18404212
- Gazendam RP, van Hamme JL, Tool AT, Hoogenboezem M, van den Berg JM, Prins JM, Vitkov L, van de Veerdonk FL, van den Berg TK, Roos D, Kuijpers TW. 2016. Human neutrophils use different mechanisms to kill *Aspergillus fumigatus* conidia and hyphae: evidence from phagocyte defects. *The Journal of Immunology* **196**:1272–1283. DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501811>, PMID: 26718340
- Goes GR, Rocha PS, Diniz AR, Aguiar PH, Machado CR, Vieira LQ. 2016. *Trypanosoma cruzi* needs a signal provided by reactive oxygen species to infect macrophages. *PLOS Neglected Tropical Diseases* **10**:e0004555. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004555>, PMID: 27035573
- Gonzaga NA, Mecawi AS, Antunes-Rodrigues J, De Martinis BS, Padovan CM, Tirapelli CR. 2015. Ethanol withdrawal increases oxidative stress and reduces nitric oxide bioavailability in the vasculature of rats. *Alcohol* **49**:47–56. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2014.12.001>, PMID: 25557835
- Gurung P, Young BM, Coleman RA, Wiechert S, Turner LE, Ray NB, Waldschmidt TJ, Legge KL, Cook RT. 2009. Chronic ethanol induces inhibition of antigen-specific CD8⁺ but not CD4⁺ immunodominant T cell responses following *Listeria monocytogenes* inoculation. *Journal of Leukocyte Biology* **85**:34–43. DOI: <https://doi.org/10.1189/jlb.0208101>, PMID: 18820175
- Gustot T, Maillart E, Bocci M, Surin R, Trépo E, Degré D, Lucidi V, Taccone FS, Delforge ML, Vincent JL, Donckier V, Jacobs F, Moreno C. 2014. Invasive aspergillosis in patients with severe alcoholic hepatitis. *Journal of Hepatology* **60**:267–274. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.09.011>, PMID: 24055548
- Huang J, Milton A, Arnold RD, Huang H, Smith F, Panizzi JR, Panizzi P. 2016. Methods for measuring myeloperoxidase activity toward assessing inhibitor efficacy in living systems. *Journal of Leukocyte Biology* **99**:541–548. DOI: <https://doi.org/10.1189/jlb.3RU0615-256R>, PMID: 26884610
- Hubbs AF, Castranova V, Ma JY, Frazer DG, Siegel PD, Ducatman BS, Grote A, Schwegler-Berry D, Robinson VA, Van Dyke C, Barger M, Xiang J, Parker J. 1997. Acute lung injury induced by a commercial leather conditioner. *Toxicology and Applied Pharmacology* **143**:37–46. DOI: <https://doi.org/10.1006/taap.1996.8053>, PMID: 9073590
- King J, Henriot S, Warris A. 2016. Aspergillosis in chronic granulomatous disease. *Journal of Fungi* **2**:15–16. DOI: <https://doi.org/10.3390/jof2020015>
- Kolaczowska E, Kubes P. 2013. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Reviews Immunology* **13**:159–175. DOI: <https://doi.org/10.1038/nri3399>, PMID: 23435331
- Kousha M, Tadi R, Soubani AO. 2011. Pulmonary aspergillosis: a clinical review. *European Respiratory Review* **20**:156–174. DOI: <https://doi.org/10.1183/09059180.00001011>
- Latgé J. 1999. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clinical Microbiology Reviews* **12**:310–350. DOI: <https://doi.org/10.1128/CMR.00140-18>
- Latgé JP. 2001. The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. *Trends in Microbiology* **9**:382–389. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(01\)02104-7](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(01)02104-7), PMID: 11514221

- Liang Y, Yeligar SM, Brown LAS. 2012. Chronic-Alcohol-Abuse-Induced oxidative stress in the development of acute respiratory distress syndrome. *The Scientific World Journal* **2012**:1–9. DOI: <https://doi.org/10.1100/2012/740308>
- Lieber CS. 2005. Metabolism of alcohol. *Clinics in Liver Disease* **9**:1–35. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cld.2004.10.005>, PMID: 15763227
- Lippai D, Bala S, Petrasek J, Csak T, Levin I, Kurt-Jones EA, Szabo G. 2013. Alcohol-induced IL-1 β in the brain is mediated by NLRP3/ASC inflammasome activation that amplifies neuroinflammation. *Journal of Leukocyte Biology* **94**:171–182. DOI: <https://doi.org/10.1189/jlb.1212659>, PMID: 23625200
- Luján M, Gallego M, Belmonte Y, Fontanals D, Vallès J, Lisboa T, Rello J. 2010. Influence of pneumococcal serotype group on outcome in adults with bacteraemic pneumonia. *European Respiratory Journal* **36**:1073–1079. DOI: <https://doi.org/10.1183/09031936.00176309>, PMID: 20150202
- Malacco NLSO, Souza JAM, Mendes AC, Rachid MA, Kraemer LR, Mattos MS, Lima GN, Sousa LP, Souza DG, Pinho V, Teixeira MM, Russo RC, Soriani FM. 2019. Acute lung injury and repair induced by single exposure of *Aspergillus fumigatus* in immunocompetent mice. *Future Microbiology* **14**:1511–1525. DOI: <https://doi.org/10.2217/fmb-2019-0214>
- Maraslioglu M, Oppermann E, Blattner C, Weber R, Henrich D, Jobin C, Schleucher E, Marzi I, Lehnert M. 2014. Chronic Ethanol Feeding Modulates Inflammatory Mediators, Activation of Nuclear Factor- κ B, and Responsiveness to Endotoxin in Murine Kupffer Cells and Circulating Leukocytes. *Mediators of Inflammation* **2014**:1–16. DOI: <https://doi.org/10.1155/2014/808695>
- Meyerholz DK, Edsen-Moore M, McGill J, Coleman RA, Cook RT, Legge KL. 2008. Chronic alcohol consumption increases the severity of murine influenza virus infections. *The Journal of Immunology* **181**:641–648. DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.1.641>, PMID: 18566431
- Molina PE, Happel KI, Zhang P, Kolls JK, Nelson S. 2010. Focus on: alcohol and the immune system. *Alcohol Res Health* **33**:97–108. PMID: 23579940
- Ng LG, Ostuni R, Hidalgo A. 2019. Heterogeneity of neutrophils. *Nature Reviews. Immunology* **19**:255–265. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0141-8>, PMID: 30816340
- Ohama H, Asai A, Ito I, Suzuki S, Kobayashi M, Higuchi K, Suzuki F. 2015. M2b macrophage elimination and improved resistance of mice with chronic alcohol consumption to opportunistic infections. *The American Journal of Pathology* **185**:420–431. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.09.022>, PMID: 25485859
- Parlet CP, Kavanaugh JS, Horswill AR, Schlueter AJ. 2015. Chronic ethanol feeding increases the severity of *Staphylococcus aureus* skin infections by altering local host defenses. *Journal of Leukocyte Biology* **97**:769–778. DOI: <https://doi.org/10.1189/jlb.4A0214-092R>, PMID: 25605871
- Phillippe B, Ibrahim-Granet O, Prévost MC, Gougerot-Pocidalo MA, Sanchez Perez M, Van der Meeren A, Latgé JP. 2003. Killing of *Aspergillus fumigatus* by alveolar macrophages is mediated by reactive oxidant intermediates. *Infection and Immunity* **71**:3034–3042. DOI: <https://doi.org/10.1128/IAI.71.6.3034-3042.2003>, PMID: 12761080
- Phillipson M, Kubes P. 2011. The neutrophil in vascular inflammation. *Nature Medicine* **17**:1381–1390. DOI: <https://doi.org/10.1038/nm.2514>, PMID: 22064428
- Pierrakos C, Vincent JL. 2010. Sepsis biomarkers: a review. *Critical Care* **14**:R15. DOI: <https://doi.org/10.1186/cc8872>, PMID: 20144219
- Pinho V, de Castro Russo R, Amaral FA, de Sousa LP, Barsante MM, de Souza DG, Alves-Filho JC, Cara DC, Hayflick JS, Rommel C, Ruckle T, Rossi AG, Teixeira MM. 2007. Tissue- and Stimulus-Dependent role of phosphatidylinositol 3-Kinase isoforms for neutrophil recruitment induced by chemoattractants in vivo. *The Journal of Immunology* **179**:7891–7898. DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.11.7891>
- Pritchard MT, Nagy LE. 2005. Ethanol-Induced liver injury: potential roles for Egr-1. *Alcoholism: Clinical & Experimental Research* **29**:146S–150. DOI: <https://doi.org/10.1097/01.alc.0000189286.81943.51>
- Reiner RG, Tanner AR, Keyhani AH, Wright R. 1981. Tanner A R, keyhani A H, Wright R. A comparative study of lysosomal enzyme activity in monocytes and kupffer cells isolated simultaneously in a rat model of liver injury. *Clinical and Experimental Immunology* **43**:376–380. PMID: 7273484
- Rios-Santos F, Alves-Filho JC, Souto FO, Spiller F, Freitas A, Lotufo CM, Soares MB, Dos Santos RR, Teixeira MM, Cunha FQ. 2007. Down-regulation of CXCR2 on neutrophils in severe Sepsis is mediated by inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **175**:490–497. DOI: <https://doi.org/10.1164/rccm.200601-103OC>, PMID: 17138957
- Robertson CM, Perrone EE, McConnell KW, Dunne WM, Boody B, Brahmabhatt T, Diacovo MJ, Van Rooijen N, Hogue LA, Cannon CL, Buchman TG, Hotchkiss RS, Coopersmith CM. 2008. Neutrophil depletion causes a fatal defect in murine pulmonary *Staphylococcus aureus* clearance. *Journal of Surgical Research* **150**:278–285. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jss.2008.02.009>, PMID: 18621398
- Romani L. 2000. Innate and adaptive immunity in *Candida Albicans* infections and saprophytism. *Journal of Leukocyte Biology* **68**:175–179. DOI: <https://doi.org/10.1189/jlb.68.2.175>, PMID: 10947060
- Russo RC, Guabiraba R, Garcia CC, Barcelos LS, Roffê E, Souza AL, Amaral FA, Cisalpino D, Cassali GD, Doni A, Bertini R, Teixeira MM. 2009. Role of the chemokine receptor CXCR2 in bleomycin-induced pulmonary inflammation and fibrosis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **40**:410–421. DOI: <https://doi.org/10.1165/rcmb.2007-0364OC>, PMID: 18836137
- Segal BH, Romani LR. 2009. Invasive aspergillosis in chronic granulomatous disease. *Medical Mycology* **47**:S282–S290. DOI: <https://doi.org/10.1080/13693780902736620>
- Simplicio JA, Gonzaga NA, Nakashima MA, De Martinis BS, Cunha TM, Tirapelli LF, Tirapelli CR. 2017. Tumor necrosis factor- α receptor 1 contributes to ethanol-induced vascular reactive oxygen species generation and

- hypertension. *Journal of the American Society of Hypertension* **11**:684–696. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jash.2017.07.008>, PMID: 28797835
- Soethout EC**, Müller KE, Rutten VP. 2002. Neutrophil migration in the lung, general and bovine-specific aspects. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **87**:277–285. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(02\)00053-3](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(02)00053-3), PMID: 12072247
- Strath M**, Warren DJ, Sanderson CJ. 1985. Detection of eosinophils using an eosinophil peroxidase assay its use as an assay for eosinophil differentiation factors. *Journal of Immunological Methods* **83**:209–215. DOI: [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(85\)90242-X](https://doi.org/10.1016/0022-1759(85)90242-X), PMID: 3840509
- Sun B**, Hu X, Liu G, Ma B, Xu Y, Yang T, Shi J, Yang F, Li H, Zhang L, Zhao Y. 2014. Phosphatase Wip1 negatively regulates neutrophil migration and inflammation. *The Journal of Immunology* **192**:1184–1195. DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300656>, PMID: 24395919
- Swamydas M**, Lionakis MS. 2013. Isolation, purification and labeling of mouse bone marrow neutrophils for functional studies and adoptive transfer experiments. *Journal of Visualized Experiments* **10**:e50586. DOI: <https://doi.org/10.3791/50586>
- Szabo G**. 1999. Consequences of alcohol consumption on host defence. *Alcohol and Alcoholism* **34**:830–841. DOI: <https://doi.org/10.1093/alcac/34.6.830>, PMID: 10659718
- Szabo G**, Saha B. 2015. Alcohol's Effect on Host Defense. *Alcohol Research : Current Reviews* **37**:159–170. PMID: 26695755
- Trejejo-Nunez G**, Chen K, Dufour JP, Bagby GJ, Horne WT, Nelson S, Kolls JK. 2015. Ethanol impairs mucosal immunity against *Streptococcus pneumoniae* infection by disrupting interleukin 17 gene expression. *Infection and Immunity* **83**:2082–2088. DOI: <https://doi.org/10.1128/IAI.02869-14>, PMID: 25754201
- Tsuchimoto Y**, Asai A, Tsuda Y, Ito I, Nishiguchi T, Garcia MC, Suzuki S, Kobayashi M, Higuchi K, Suzuki F. 2015. M2b monocytes provoke bacterial pneumonia and gut Bacteria-Associated Sepsis in alcoholics. *The Journal of Immunology* **195**:5169–5177. DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501369>, PMID: 26525287
- Urso T**, Gavaler JS, Van Thiel DH. 1981. Blood ethanol levels in sober alcohol users seen in an emergency room. *Life Sciences* **28**:1053–1056. DOI: [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(81\)90752-9](https://doi.org/10.1016/0024-3205(81)90752-9), PMID: 7219065
- Wood S**, Pithadia R, Rehman T, Zhang L, Plichta J, Radek KA, Forsyth C, Keshavarzian A, Shafikhani SH. 2013. Chronic alcohol exposure renders epithelial cells vulnerable to bacterial infection. *PLOS ONE* **8**:e54646. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054646>, PMID: 23358457
- World Health Organisation**. 2014. *Global Status Report on Alcohol and Health 2014*: WHO. http://www.who.int/substance_abuse/publications/global_alcohol_report/msbgsruprofiles.pdf.
- Yago T**, Liu Z, Ahamed J, McEver RP. 2018. Cooperative PSGL-1 and CXCR2 signaling in neutrophils promotes deep vein thrombosis in mice. *Blood* **132**:1426–1437. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2018-05-850859>, PMID: 30068506
- Yeligar SM**, Harris FL, Hart CM, Brown LA. 2012. Ethanol induces oxidative stress in alveolar macrophages via upregulation of NADPH oxidases. *The Journal of Immunology* **188**:3648–3657. DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101278>, PMID: 22412195
- Yeligar SM**, Harris FL, Hart CM, Brown LAS. 2014. Glutathione attenuates ethanol-induced alveolar macrophage oxidative stress and dysfunction by down-regulating NADPH oxidases. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* **4**:429–441. DOI: <https://doi.org/10.1152/ajplung.00159.2013>
- Yen CH**, Ho PS, Yeh YW, Liang CS, Kuo SC, Huang CC, Chen CY, Shih MC, Ma KH, Sung YF, Lu RB, Huang SY. 2017. Differential cytokine levels between early withdrawal and remission states in patients with alcohol dependence. *Psychoneuroendocrinology* **76**:183–191. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2016.10.015>, PMID: 27951519
- Zemans RL**, Colgan SP, Downey GP. 2009. Transepithelial migration of neutrophils: mechanisms and implications for acute lung injury. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **40**:519–535. DOI: <https://doi.org/10.1165/rcmb.2008-0348TR>, PMID: 18978300
- Zhang H**, Zhang F, Zhu Z, Luong D, Meadows GG. 2015. Chronic alcohol consumption enhances iNKT cell maturation and activation. *Toxicology and Applied Pharmacology* **282**:139–150. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.taap.2014.11.013>, PMID: 25499027

6 CAPÍTULO 3 – O EFEITO DO CONSUMO CRÔNICO DE ETANOL NA RESOLUÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA FRENTE AO *Aspergillus fumigatus*

6.1 Inflamação e resolução da resposta inflamatória

A inflamação é um processo bastante complexo e coordenado que tem um papel fisiológico de extrema importância para o funcionamento e manutenção da homeostase dos mamíferos (MEDZHITOV, 2010). É classicamente desencadeada por uma infecção ou por um dano tecidual e tem como função principal resolver essa infecção (ou reparar o dano) e retornar ao estado de homeostase de todas as estruturas atingidas (CHOVATIYA; MEDZHITOV, 2014; VARELA et al., 2018). O desenvolvimento de uma resposta inflamatória apropriada é essencial para a defesa do hospedeiro contra qualquer estímulo infeccioso. Na ausência de inflamação, uma doença pode se tornar bastante grave e até mesmo letal. Por outro lado, a inflamação excessiva ou descontrolada pode culminar em um estágio irreversível, levando a morte após uma infecção (MEDZHITOV, 2008).

A cascata da resposta inflamatória consiste em diversas etapas envolvendo mediadores e células que interagem entre si para montar uma resposta eficiente. São eles: indutores, sensores, mediadores e efetores. Em uma infecção, a inflamação é iniciada pela interação de componentes estruturais de patógenos (indutores), conhecidos como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), por receptores presentes nas células da imunidade inata, os receptores de reconhecimento padrão (PRRs), tais como os receptores do tipo *Toll* (TLRs) e receptores do tipo NOD (NLRs), presentes em macrófagos residentes no tecido afetado (sensores). Esta interação faz com que estes macrófagos sejam ativados e produzam uma variedade de mediadores inflamatórios incluindo citocinas, quimiocinas, prostaglandinas e leucotrienos (VARELA et al., 2018). Esses mediadores têm funções sobrepostas e distintas e vão orquestrar o recrutamento de leucócitos, tais como neutrófilos circulantes (efetores), para o sítio de infecção (BASIL; LEVY, 2016).

As células inflamatórias do sistema imune possuem funções que são essenciais para a homeostase do hospedeiro. Essas células têm a habilidade de responder à estímulos ambientais e desencadear várias funções em respostas a eles. As mesmas células imunes

podem apresentar diferentes morfologias, desde sentinelas a fagócitos profissionais, migrar de um tecido para outro distinto, se expandir clonalmente, modular a expressão de receptores e outras proteínas, secretar moléculas efetoras e exercer o controle de células adjacentes (BUCK et al., 2017). Os macrófagos são células fagocíticas, ou seja, a fagocitose de microrganismos e partículas invasoras é uma de suas funções mais importantes. Estas células também atuam na remoção de restos celulares, como os provenientes de células apoptóticas, processo chamado eferocitose (HEROLD; MAYER; LOHMEYER, 2011). Já os neutrófilos representam a primeira linha de células migratórias na reação do organismo contra patógenos e são componentes essenciais da resposta inflamatória aguda (NG; OSTUNI; HIDALGO, 2019). A migração neutrofílica é essencial para o retorno à homeostase e sobrevivência do hospedeiro em casos de infecção (TAN et al., 2020).

Além da produção de mediadores pró-inflamatórios, como IL-1 β , IL-6, TNF- α pelos macrófagos residentes dos tecidos infectados, os linfócitos T *helper* (Th) 17 e a resposta Th17 têm grande importância na manutenção da resposta inflamatória neutrofílica (KOYASU; MORO, 2012). As células Th17, caracterizadas pela produção de IL-17, estimulam as células epiteliais, endoteliais e macrófagos a produzirem citocinas e quimiocinas inflamatórias (tais como CXCL8, IL-1 β , IL-23 e IL-6) e peptídeos antimicrobianos, induzindo tanto o acúmulo quanto a maior sobrevivência de neutrófilos, desempenhando um importante papel no controle de infecções bacterianas e fúngicas (KOYASU; MORO, 2012; THAKUR et al., 2015; ZHU; YAMANE; PAUL, 2010).

O processo inflamatório inclui eventos vasculares e celulares, ocorrendo fenômenos na microcirculação como a angiogênese, liberação de moléculas solúveis e acúmulo de neutrófilos e influxo de monócitos, que se diferenciam em macrófagos no tecido e auxiliam o combate a infecção (NORLING; SERHAN, 2010; SOEHNLEIN; LINDBOM, 2010). No sistema imune, a ativação, crescimento e proliferação, realização das funções efetoras e retorno à homeostase tecidual são intimamente ligadas (BUCK et al., 2017; LIU et al., 2012a). A função principal do infiltrado inflamatório é combater o agente causador da infecção (ou o estímulo inflamatório) e resolver qualquer dano tecidual que tenha sido causado pela inflamação. Concomitantemente à reação inflamatória, há também uma série de eventos e recrutamento de outros tipos celulares que visam controlar e balancear a resposta inflamatória, com o objetivo de resolver resposta inflamatória (SUGIMOTO et al., 2019) (Figura 1).

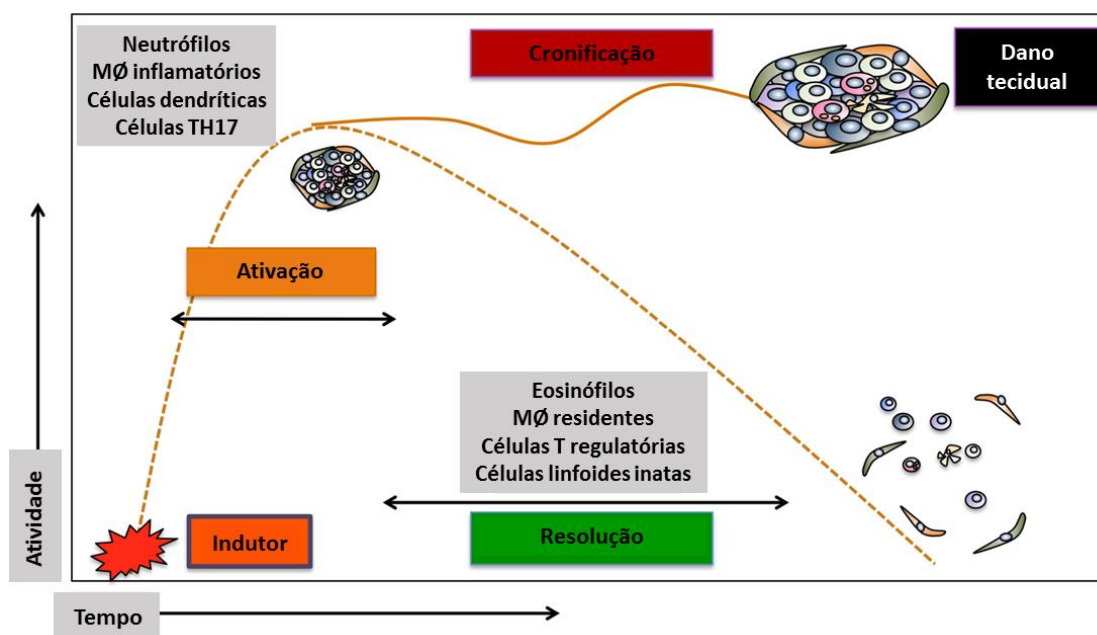


Figura 1. Dinâmica entre a ativação e resolução da resposta inflamatória. Após um estímulo inflamatório (indutor), há a montagem de uma resposta inflamatória, que conta com as fases de ativação e resolução. Essas fases apresentam recrutamento de células-chave (retângulos cinza) e mediadores característicos. Além disso, a falha na resolução da inflamação leva à cronificação da inflamação. MΦ – macrófagos. Fonte: Georg Schett & Markus F. Neurath, 2018. Resolution of chronic inflammatory disease: universal and tissue-specific concepts (adaptado).

Durante o processo inflamatório, acontecem também vários eventos que culminam na resolução da resposta inflamatória, como a eliminação do agente infeccioso que desencadeou a resposta imune. Além disso, há também a síntese de mediadores pró-inflamatórios é cessada e os mediadores remanescentes são catabolizados, cessando também o recrutamento de leucócitos adicionais e a formação de edema. As células imunes presentes no tecido acometido sofrem apoptose e subsequente fagocitose pelos macrófagos (FULLERTON, 2016; SHINOHARA, 2016). Todas essas ações celulares complexas são orquestradas por mediadores pró-resolutivos, que controlam cada um desses processos bem como o equilíbrio entre eles (BASIL, 2016).

Dependendo do estímulo, a resposta inflamatória aguda é autolimitante, já que há um balanço entre a produção de mediadores pró- e anti-inflamatórios, o que posteriormente leva à diminuição da inflamação, para que o tecido ou órgão lesado

restaure sua homeostase. A resolução da resposta inflamatória baseia-se em (1) inativação do neutrófilo, bem como a promoção da apoptose e depuração dessas células em conjunto com o recrutamento e diferenciação de macrófagos em um fenótipo anti-inflamatório; (2) produção de mediadores pró-resolutivos que sinalizam para a restauração da integridade vascular; (3) regeneração de tecidos lesados; (4) remissão da febre por inibição de mediadores pró-inflamatórios lipídicos e citocinas e (5) alívio da dor inflamatória. Em conjunto, a remoção, restauração, regeneração, remissão e alívio são os cinco sinais cardinais da resolução (BASIL; LEVY, 2016).

As quimiocinas, citocinas e outros mediadores pró-inflamatórios atuam de maneira coordenada para orquestrar tanto o início da reação inflamatória quanto a resolução da inflamação (HEADLAND; NORLING, 2015). No entanto, uma melhor compreensão da modulação da sinalização fisiológica em um contexto pró-resolutivo na relação com possíveis alterações provocadas pelo consumo crônico de etanol se faz necessário.

6.2 Metodologia

6.2.1 Animais experimentais

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

6.2.2 Modelo de alcoolismo

O modelo murino de consumo crônico de etanol foi seguido de acordo com modelo padronizado por Yeligar e colaboradores (2012). Esse modelo reproduz os níveis de álcool no sangue após o consumo crônico de etanol em indivíduos humanos (YELIGAR et al., 2012). O álcool etílico (Synth) foi disponibilizado para os animais em uma solução aquosa contendo etanol, durante 12 semanas. Inicialmente, os camundongos passaram por um período de aclimação e adaptação a ingestão forçada de etanol, sendo disponibilizada exclusivamente a solução de etanol a 5% (v/v) na primeira semana, 10% (v/v) na segunda semana e 20% (v/v) nas 10 semanas seguintes.

6.2.3 Infecção intranasal com *A. fumigatus*

Conídios de *A. fumigatus* linhagem A1163 foram semeados em placa de Petri contendo meio completo (YAG) (2% p/v de glicose, 2% p/v de ágar, 0,5% p/v de extrato de levedura e elementos de traço) e incubados em estufa a 37°C durante 48 horas (SORIANI et al., 2008). Após o período de incubação, foi preparada uma suspensão de conídios com 30 mL de solução salina tamponada (PBS 1X), em condição estéril. Os conídios suspensos foram filtrados através de uma membrana de *nylon* estéril de 40 µm, para remover fragmentos de hifas. A suspensão foi então centrifugada a 2700 rpm por 10 minutos a 24°C. Após centrifugação, o *pellet* de conídios foi ressuscitado em 1 mL de PBS 1X estéril, diluído e os conídios contados em câmara de Neubauer. A concentração foi ajustada para 1×10^8 conídios em 40 µL de suspensão fúngica, antes da inoculação. Foram empregadas, para o inóculo experimental, culturas de *A. fumigatus* que apresentaram, pelo menos, 90% de viabilidade.

O modelo de aspergilose pulmonar foi realizado com modificações no método de Brieland e colaboradores (2001) (BRIELAND et al., 2001), descrito por nosso grupo (MALACCO et al., 2020). Após as 12 semanas de tratamento, os animais controle que consumiram somente água e os animais tratados, que consumiram etanol, foram anestesiados por vaporização de até 3% de isoflurano (Biochimico). Aproximadamente 30 segundos após administração do isoflurano, os camundongos foram infectados, via intranasal (i.n.), com 1×10^8 conídios de *A. fumigatus*. Para infecção, o animal foi contido manualmente e, em seguida, foi administrado a suspensão fúngica pela narina do animal. Os animais foram observados até o término do efeito da anestesia.

6.2.4 Leucograma

Após as 12 semanas de tratamento com etanol, os animais foram eutanasiados via i.p., com uma solução letal de 75 mg/kg de cetamina e 5 mg/kg de xilazina. Aproximadamente 500 uL de sangue foi coletado a partir da veia cava inferior, usando seringas heparinizadas. Células totais foram contadas em câmara de Neubauer, após diluição de 20 vezes (1:20) em Líquido de Turk, e a contagem diferencial foi realizada a partir de lâminas de esfregaço sanguíneo coradas com *kit* Panótico rápido (Laborclin), seguida de visualização em microscópio óptico utilizando objetiva de imersão (100 x). Para cada lâmina examinada foram contados um total de 200 leucócitos, diferenciados por critérios morfológicos em dois tipos celulares: células polimorfonucleares e células mononucleares. A quantidade de cada tipo celular foi calculada a partir da porcentagem encontrada em relação ao número total de células. Os valores obtidos foram expressos em número de células por mL de sangue.

6.2.5 Lavado broncoalveolar (BAL)

Após 1, 2, 4 e 6 dias de eutanásia foi realizado o lavado broncoalveolar (BAL) para avaliar o perfil de células inflamatórias presentes no sítio infeccioso. A traqueia de cada animal foi exposta e canulada com um cateter de polipropileno (1,7 mm). O lavado foi realizado pela injeção de duas alíquotas de 1 mL de PBS 1X estéril gelado, por três vezes cada uma, obtendo-se, aproximadamente, 2 mL de volume final recuperado do lavado. O fluido recolhido do lavado foi centrifugado 1700 rpm por 10 minutos a 4°C, e o sobrenadante resultante foi coletado e armazenado em freezer -20°C para posteriores ensaios de detecção de citocinas e para avaliação de extravasamento de proteínas plasmáticas. O sedimento de células foi ressuspenso em 100 µL de solução de PBS 1X para a contagem total de leucócitos.

6.2.6 Contagem total e diferencial das células do BAL

A contagem do número total de leucócitos presentes no BAL foi realizada na diluição de 1:10 em Líquido de Turk e utilização da câmara de Neubauer para visualização em microscópio óptico. A contagem diferencial das células foi realizada em

lâminas preparadas em citocentrífuga (CT-2000, Cientec), a 95 g por 5 minutos, e submetidas à coloração com *kit* Panótico rápido, seguida de visualização em microscópio óptico em objetiva de imersão (100 x). Para cada lâmina examinada foram contados 300 leucócitos, diferenciados por critérios morfológicos em quatro tipos celulares: neutrófilos, eosinófilos, macrófagos e linfócitos. A quantidade de cada tipo celular foi calculada a partir da quantidade encontrada em relação ao número total de células. Os valores obtidos foram expressos em número de células por BAL.

6.2.7 Determinação do índice de resolução

O índice de resolução (Ri) foi avaliado de acordo com a literatura (PRÜSS et al., 2011; VAGO et al., 2016). Após a determinação do número total e diferencial de leucócitos no BAL após 1, 2, 4 e 6 dias de infecção por *A. fumigatus*, o índice de resolução foi determinado de acordo com: 1) a magnitude, calculado por Ψ_{\max} and T_{\max} , sendo Ψ_{\max} o máximo de células polimorfonucleares (PMN) e T_{\max} o momento em que o número de PMN atinge seu máximo; 2) a duração, medida por T_{50} , que é o momento em que o número de PMN reduz para 50% do máximo; e 3) o índice de resolução, que é o intervalo entre o T_{\max} e o T_{50} .

6.2.8 Avaliação da atividade de mieloperoxidase (MPO)

O acúmulo de neutrófilos no tecido pulmonar foi avaliado por meio do ensaio de atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), o que permite indicar indiretamente o infiltrado neutrofílico no sítio de infecção (HUANG et al., 2016). Após a eutanásia dos animais, 100 mg de tecido pulmonar, obtidos de animais controle e infectados, foram homogeneizados em 1,9 mL de tampão I (0,1 M NaCl, 0,02 M NaPO₄, 0,015 M NaEDTA, pH 4,7), utilizando-se homogeneizador elétrico de tecidos (Power Gen 125 - Fisher Scientific Pennsylvania, USA) e centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos a 4 °C, descartando-se o sobrenadante. O precipitado foi submetido à lise hipotônica com 1,5 mL de solução NaCl 0,2% (p/v) durante 30 segundos, seguida pela adição de 1,5 mL de solução contendo NaCl 1,6% (p/v) e glicose 5% (p/v) e, após, submetido a centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos a 4 °C. O precipitado foi suspenso em tampão II (NaPO₄ 0,05 M - pH 5,4, contendo 0,5% (p/v) de brometo de hexadeciltrimetilamônio - HTAB)

e homogeneizado. As suspensões foram submetidas a três ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido e centrifugadas por 10.000 rpm por 15 minutos a 4 °C, coletando-se o sobrenadante para o ensaio. O ensaio de MPO foi conduzido adicionando 25 µL da amostra na diluição 1:3, em duplicata, em microplaca de 96 poços (o tampão II correspondeu ao branco). A reação foi iniciada pela adição de 25 µL do substrato 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB, Sigma) dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO, Merck, Darmstadt, Alemanha) com concentração final de 1,6 mM e incubação a 37 °C por 5 minutos. Após, adicionou-se 100 µL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) diluído numa concentração final de 0,002% (v/v) em tampão II e incubou-se a 37°C por 5 minutos. Acrescentou-se 100 µL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 1 M para término da reação. A atividade de MPO foi avaliada pela medida das alterações na densidade óptica (D.O.) em espectrofotômetro de microplacas (µQuant™, Biotek, Winooski, Vermont, USA) a 450 nm. Os resultados foram expressos em unidades relativas de acordo com uma curva-padrão de neutrófilos purificados (> 95% pureza) da cavidade peritoneal de camundongos estimulados com caseína 5%.

6.2.9 Avaliação da atividade de N-acetilglicosaminidase (NAG)

O acúmulo de macrófagos no tecido pulmonar foi avaliado pelo ensaio de atividade da enzima NAG (REINER et al., 1981). Cem mg de tecido pulmonar, obtidos de animais controle e infectados, foram homogeneizados em 1,9 mL de tampão I (0,1 M NaCl, 0,02 M NaPO₄, 0,015 M NaEDTA, pH 4,7) e centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos a 4 °C, descartando-se o sobrenadante. O precipitado foi submetido a lise hipotônica com 1,5 ml de solução NaCl 0,2% (p/v) durante 30 segundos, seguida pela adição de igual volume da solução contendo NaCl 1,6% (p/v) e glicose 5% (p/v). Após uma centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos a 4 °C, o precipitado foi suspenso e homogeneizado em solução salina 0,9% (p/v) com 0,1% (v/v) de Triton X-100. A solução foi centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi coletado para o ensaio. A reação foi realizada pela adição de 100 µL de cada amostra em microplacas de 96 poços, seguido da adição de 100 µL de p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glicosaminidina (NAG, Sigma), diluído em tampão citrato/fosfato (C₆H₈O₇ 0,1 M; Na₂HPO₄ 0,1 M, pH 4,5), e incubação a 37 °C por 10 minutos. O término da reação ocorreu pela adição de 100 µL de tampão glicina 0,2 M (pH 10,6). Foi realizada leitura em espectrofotômetro de

microplacas com comprimento de onda de 405 nm. O número de macrófagos foi calculado a partir de uma curva-padrão de atividade de NAG expressa a partir de macrófagos obtidos da cavidade peritoneal de camundongos estimulados com tioglicolato 3%. Os resultados foram expressos em número relativo de macrófagos em 100 mg de tecido.

6.2.10 Quantificação de citocinas e quimiocinas por ELISA

As concentrações das citocinas e quimiocinas TNF- α , IL-10, CXCL1, CCL2, IL-4, CXCL2, TGF- β foram quantificadas no BAL após a infecção, pelo método imunoenzimático de ELISA sanduíche, utilizando-se kits de anticorpos murinos específicos para cada citocina, seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante (R&D Systems, Minneapolis, USA). Para a realização do ensaio, os anticorpos de captura foram diluídos em PBS estéril e adicionados 100 μ L/poço em microplacas de 96 poços (C96 MicroWell™ Plates, Nunc, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), na concentração indicada pelo fabricante. Após a sensibilização das placas durante 18 horas a 4°C, as mesmas foram lavadas três vezes com solução PBS acrescida de 0,05% (v/v) de Tween 20 (PBS-T ou tampão de lavagem). Após as lavagens, foram adicionados 200 μ L/poço de tampão fosfato com 1% (p/v) de BSA (tampão de bloqueio), seguido de incubação à temperatura ambiente por uma hora em agitação. Após o bloqueio, os poços foram novamente lavados com tampão de lavagem e adicionados 100 μ L das amostras experimentais. Foi preparada a curva-padrão com os mediadores recombinantes de acordo com as instruções do fabricante. As placas foram novamente incubadas a 4°C por 18 horas. Após, as placas foram lavadas e foi adicionado 100 μ L/poço dos anticorpos de detecção biotinizados, na concentração indicada pelo fabricante. As placas foram incubadas por duas horas à temperatura ambiente. Após esta incubação, foi realizado novo ciclo de lavagem, seguido da adição de 100 μ L/poço de solução de streptavidina conjugada com peroxidase (HRP-Streptavidin, Pharmingen - 1:4000) e incubação por 20 minutos à temperatura ambiente. As placas foram submetidas novamente ao ciclo de lavagem e à revelação da reação foi realizada pela adição de 100 μ L/poço de solução de *o-phenylenediamine dihydrochloride* (OPD, Sigma) e incubação por 20 minutos à temperatura ambiente no escuro. A reação foi bloqueada adicionando 50 μ L/poço de H₂SO₄ 1M. Foi avaliada a D.O. em espectrofotômetro de microplaca com filtro de 492

nm e a concentração calculada a partir da curva padrão. Os resultados foram apresentados como a concentração da citocina ou quimiocina em pg.

6.2.11 Quantificação de proteínas totais

Foi realizada a quantificação das proteínas totais no BAL com base no método de Bradford (BRADFORD, 1976) utilizando-se o reagente Bio-Rad *Protein Assay*. Este método foi utilizado para avaliar o extravasamento de proteínas plasmáticas para os alvéolos. A reação foi realizada pela adição de 40 µL do reagente para 160 µL do sobrenadante do BAL, em microplacas de 96 poços. A D.O. foi avaliada em espectrofotômetro de microplaca com filtro de 595 nm. A concentração de proteínas das amostras foi avaliada a partir da comparação com uma curva padrão. Os resultados foram apresentados em mg/mL.

6.2.12 Análise estatística

As análises estatísticas e a construção dos gráficos foram realizadas utilizando o software *GraphPad Prism* versão 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, EUA). As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram determinadas pela Análise de variância de uma via (One Way-ANOVA), seguida pelo método pós-teste de *Tukey*. Resultados envolvendo dois grupos experimentais foram analisados pelo teste *t Student*. Os resultados foram expressos em média ± desvio padrão. Todos os dados foram considerados estatisticamente significantes se $p < 0,05$.

6.3 Resultados

6.3.1 Cinética de recrutamento celular

Para se avaliar o efeito do consumo crônico de etanol na resolução da resposta pró-inflamatória, causada pela infecção por *A. fumigatus* foi realizada uma cinética de recrutamento celular para o foco infeccioso. Após as 12 semanas de tratamento com

etanol, os camundongos foram infectados com 1×10^8 conídios de *A. fumigatus* e as células recrutadas para os alvéolos pulmonares foram quantificadas após 1, 2, 4 e 6 dias.

Os resultados mostraram que a infecção induziu um aumento significativo no recrutamento de células inflamatórias após 1 dia de infecção, atingindo um pico no segundo dia e voltando aos níveis basais até o 6º dia de infecção, nos animais controle (que consumiram somente água). Já nos animais tratados com etanol, o número de células encontradas foi significativamente reduzido em todos os pontos após a infecção, em comparação com os animais controle (Figura 2A). Dentre as células totais, o principal tipo celular presente foram os neutrófilos. Assim como na contagem de células totais, os camundongos tratados com etanol apresentaram uma redução significativa do recrutamento de neutrófilos em todos os pontos avaliados, em comparação ao grupo controle (Figura 2B).

No tecido pulmonar, a infecção por *A. fumigatus* induziu o aumento de neutrófilos em todos os pontos avaliados após a infecção, enquanto nos camundongos tratados com etanol foi observada uma redução significativa do acúmulo dessas células no tecido, após 1, 2 e 6 dias de infecção (Figura 2C).

Com relação a quantidade de macrófagos nas vias aéreas, foi observado nos animais controle que essas células permanecem em níveis basais até o segundo dia de infecção, atingindo seu pico no dia 4, após infecção. Já os camundongos tratados com etanol apresentaram números significativamente menores de macrófagos no sítio infeccioso nos dias 2, 4 e 6, comparado com animais controle após infecção (Figura 2D).

O acúmulo de macrófagos no tecido pulmonar foi semelhante entre os grupos controle e tratado com etanol nos dias 1 e 4, após infecção, e significativamente menor no grupo tratado com etanol nos dias 2 e 6, comparado com os animais controle após a infecção fúngica (Figura 2E).

Em relação aos linfócitos, houve um aumento a partir do segundo dia após infecção nos animais controle, com pico no dia 4 de infecção. Os animais que consumiram etanol também apresentaram uma redução significativa da quantidade dessas células no BAL, comparado com os animais controle. (Figura 2F).

Já os eosinófilos não apresentaram nenhuma alteração significativa entre os animais controles não tratados e os que consumiram etanol (Figura 2G).

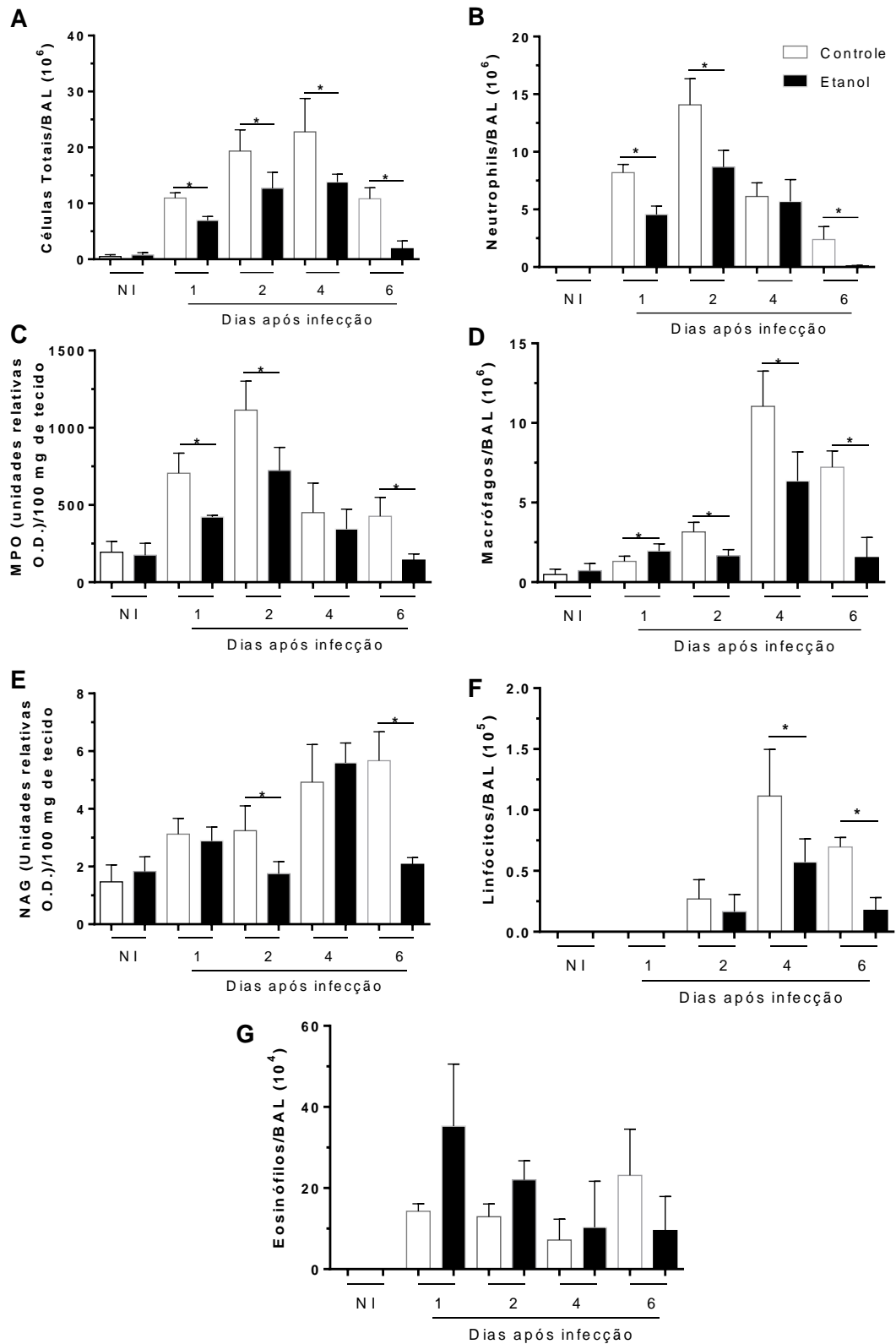


Figura 2. O consumo de etanol causou alterações na cinética de recrutamento celular para o sítio infeccioso e pulmões frente ao *A. fumigatus*. Camundongos controle e tratados com etanol foram inoculados com 10^8 conídios de *A. fumigatus*. Após 1, 2, 4 e 6 dias de infecção, o BAL e pulmões foram coletados. (A) Células totais, (B) neutrófilos, (D) macrófagos, (F)

linfócitos e (G) eosinófilos foram quantificados. Medida indireta do acúmulo de (C) neutrófilos, pela medida da atividade de MPO e de (E) macrófagos, pela medida da atividade de NAG no tecido pulmonar. Os resultados foram expressos como média \pm SD (n=5 a 6 camundongos por grupo). *Diferença significativa ($p < 0,05$).

No intuito de avaliar se a diminuição no recrutamento de diversos tipos celulares foi devido ao efeito do consumo de etanol na produção de células pela medula óssea, foi realizado um leucograma nos animais após o período de tratamento com etanol. Os resultados mostraram que não houve nenhuma diferença na quantidade de células totais, células mononucleares e células polimorfonucleares no sangue circulante dos animais tratados com etanol, em comparação com os animais do grupo controle (Figura 3A-C), indicando que o tratamento com etanol não afetou a produção de células pela medula óssea.

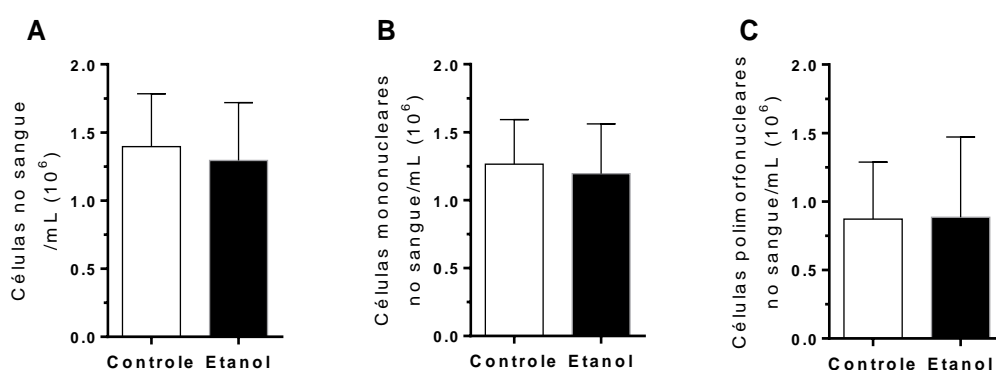


Figura 3. O consumo crônico de etanol não altera a quantidade de leucócitos circulantes no sangue de camundongos após tratamento com etanol. Após 12 semanas de tratamento com etanol, os animais foram anestesiados e o sangue foi coletado para posterior contagem de leucócitos. Foram avaliadas as células totais (A), e contagem diferencial de células mononucleares (B) e (C) células polimorfonucleares. Os resultados foram expressos como média \pm SD (n=5 a 6 camundongos por grupo).

Outro parâmetro relacionado a inflamação aguda e a migração de células tanto para o tecido pulmonar quanto para os alvéolos é a permeabilidade vascular. Durante um processo inflamatório, a microvasculatura sofre rupturas entre as junções celulares, que

culminam na formação de lacunas que fornecem uma rota passagem de células inflamatórias do fluxo sanguíneo para os tecidos (CLAESSON-WELSH, 2015). A alteração na permeabilidade vascular foi investigada pela análise de extravasamento de proteínas plasmáticas para os alvéolos. Foi observado que, após a infecção, há um grande extravasamento de proteínas plasmáticas em ambos os grupos de animais. Contudo, para os camundongos tratados com álcool houve aumento significativo no extravasamento de proteínas após 2 dias de infecção e redução em 6 dias de infecção (Figura 4).

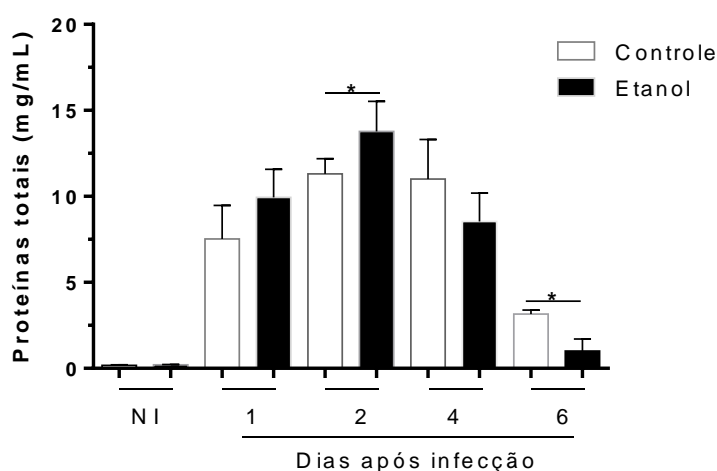


Figura 4. O consumo de etanol altera a permeabilidade vascular nos camundongos. Camundongos controle e tratados com etanol foram inoculados com 10^8 conídios de *A. fumigatus*. Após 1, 2, 4 e 6 dias de infecção, o BAL foi coletado, centrifugado e o sobrenadante congelado. A quantificação de proteínas totais do sobrenadante foi realizada pelo método de Bradford. Os resultados foram expressos como média \pm SD (n=5 a 6 camundongos por grupo). *Diferença significativa ($p < 0,05$).

6.3.2 Índice de resolução da resposta inflamatória

Os principais eventos da resolução da resposta inflamatória podem ser quantificados pelo índice de resolução, consistindo em Ψ_{max} , que é o número máximo de infiltração de neutrófilos; T_{max} , o momento em que o número de neutrófilos atinge seu máximo; e o índice de resolução (R_i), que é o intervalo de tempo entre o tempo em

que os neutrófilos chegaram a seu número máximo e o momento em que a quantidade de neutrófilos está reduzida em 50%.

A infecção por *A. fumigatus* promove uma intensa migração de neutrófilos para o sítio infeccioso no dia 1 após infecção, chegando a um pico de infiltração no dia 2. Após esse período, a quantidade de neutrófilos começa a cair progressivamente até o dia 6 após infecção, sugerindo que a infecção por *A. fumigatus* caminha para a resolução espontânea. No entanto, ao calcular o Ri de ambos os grupos de animais, foi observado que os camundongos tratados com etanol apresentam atraso em Ri em comparação aos animais controle. Enquanto os animais que beberam água exibiram Ri de cerca de 47 horas, os animais tratados com álcool apresentaram Ri de aproximadamente 60 horas (Figura 5).

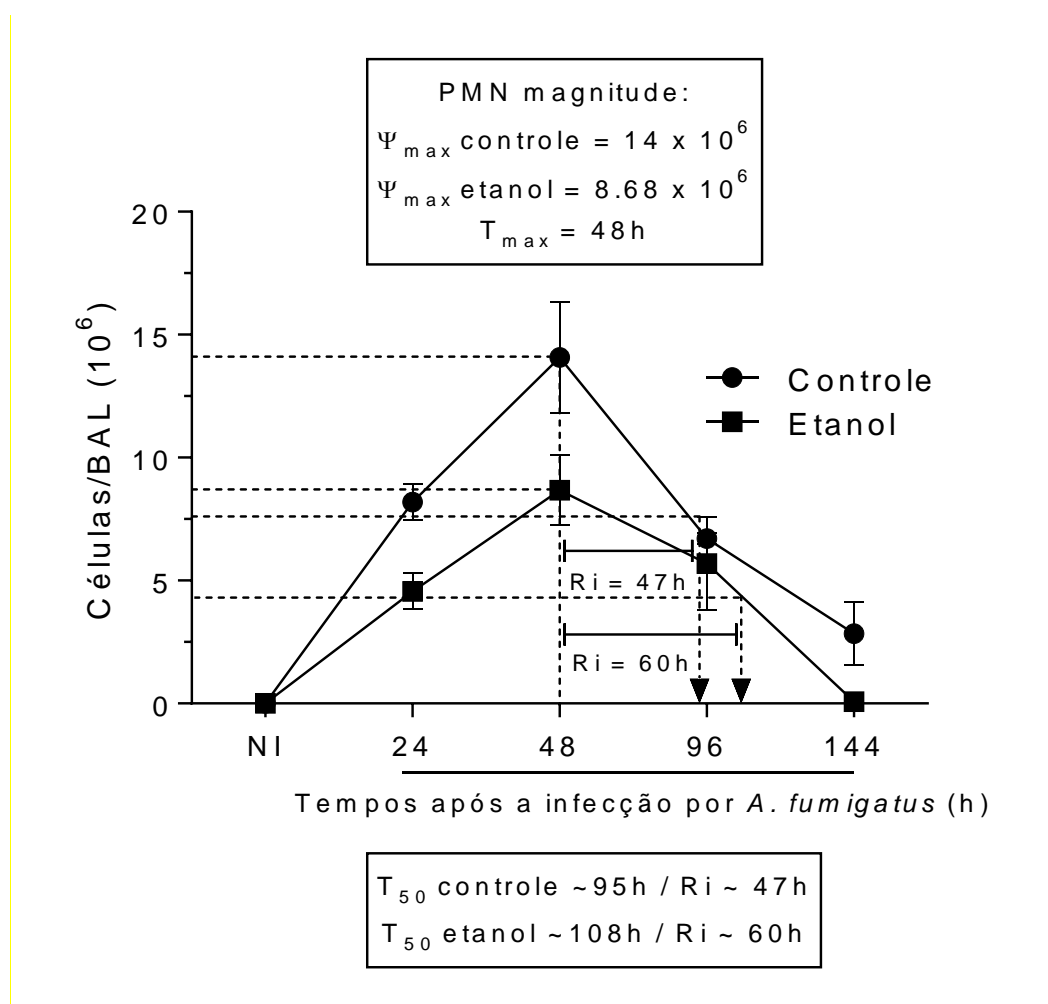


Figura 5. O tratamento com etanol atrasou a resolução da resposta inflamatória nos camundongos. Após a determinação do número total e diferencial de leucócitos após 1, 2, 4 e 6 dias após a infecção por *A. fumigatus*, o índice de resolução foi determinado de acordo com: 1) a magnitude, calculado por Ψ_{max} and T_{max} , sendo Ψ_{max} o máximo de células polimorfonucleares (PMN) e T_{max} o momento em que o número de PMN atinge seu máximo; 2) a duração, medida

por T50, que é o momento em que o número de PMN reduz para 50% do máximo; e 3) o índice de resolução, que é o intervalo entre o Tmax e o T50. Os resultados foram expressos como média \pm SD (n=5 a 6 camundongos por grupo). *Diferença significativa ($p < 0,05$).

6.3.3 Concentração de mediadores inflamatórios

No intuito de avaliar se o consumo crônico de etanol altera o balanço entre os mediadores pró-inflamatórios e pró-resolutivos, foram avaliados a concentração de diversos mediadores no curso da infecção por *A. fumigatus*.

Em relação a citocina pró-inflamatória TNF- α , foi observado um aumento significativo após um dia de infecção nos camundongos tratados com álcool em comparação aos camundongos do grupo controle. Nos demais pontos pós infecção, os níveis dessa citocina foram semelhantes entre os grupos (Figura 6A)

No que se refere as quimiocinas CXCL1 e CXCL2, quimiotáticas para neutrófilos (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013), foi observado que os animais tratados com etanol apresentaram aumento de CXCL1 após 1 e 2 dias de infecção, em comparação aos animais controle (Figura 6B). Para CXCL2, houve um aumento significativo no ponto de 2 dias de infecção nos animais tratados com etanol em comparação ao grupo controle (Figura 6C). Já para CCL2, uma quimiocina que atua principalmente no recrutamento de monócitos, não foram observadas diferenças significativas nos pontos iniciais da infecção por *A. fumigatus*. No entanto, no dia 6 após infecção, foi observado uma redução significativa dessa quimiocina nos animais tratados com etanol (Figura 6D).

Para a citocina anti-inflamatória IL-10 observou-se que os animais tratados com etanol apresentaram aumento dessa citocina após 1 e 2 dias de infecção, em comparação aos animais controle (Figura 6E). Em relação à citocina regulatória TGF- β , notou-se que um pico de aumento dessa citocina apenas no dia 2 após infecção, que não foi observado para os animais tratados com etanol (Figura 6F). Por fim, para a citocina IL-4, uma citocina relacionada a resposta Th2, foi observado que após a infecção por *A. fumigatus* há uma queda nos níveis dessa citocina, e que voltam as quantidades basais após 6 dias de infecção, com níveis semelhantes entre os camundongos tratados com álcool em comparação aos camundongos do grupo controle (Figura 6G).

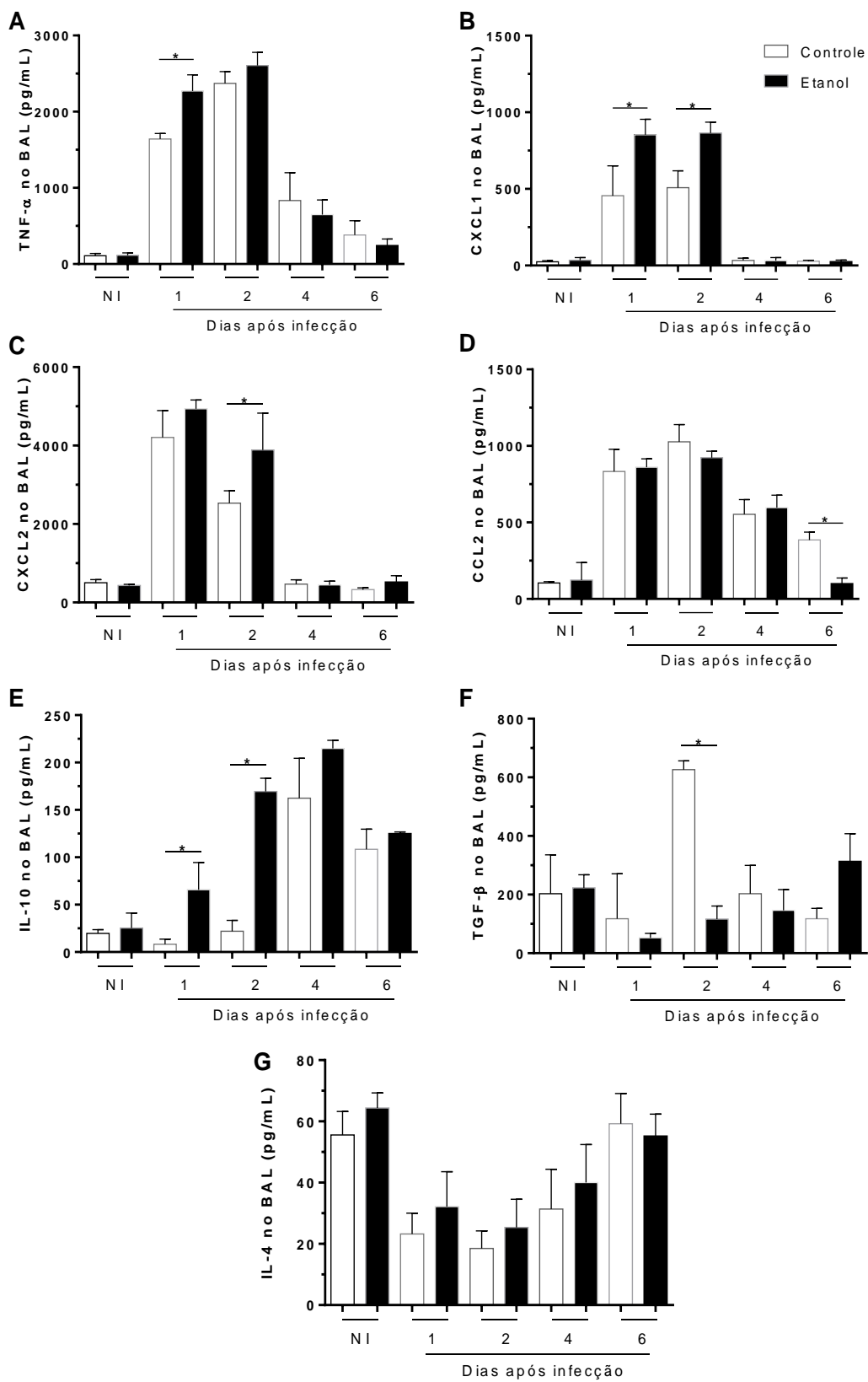


Figura 6. O consumo crônico de etanol altera o balanço de mediadores após infecção por A.

fumigatus. Camundongos controle e tratados com etanol foram inoculados com 10^8 conídios de *A. fumigatus*. Após 1, 2, 4 e 6 dias de infecção o BAL foi coletado e a quantificação de mediadores no sobrenadante foi realizada pelo ensaio de ELISA para (A) TNF, (B) CXCL1, (C) CXCL2, (D) CCL2, (E) IL-10, (F) TGF β e (G) IL-4. Os resultados foram expressos como média \pm SD (n=5 a 6 camundongos por grupo). *Diferença significativa ($p < 0,05$).

7 CAPÍTULO 4 – MECANISMOS CELULARES RELACIONADOS A DEFICIÊNCIA NA MIGRAÇÃO NEUTROFÍLICA APÓS EXPOSIÇÃO AO ETANOL

7.1 Migração de neutrófilos

7.1.1 A cascata de ativação e migração de neutrófilos

A sinalização celular é essencial para garantir o recrutamento de neutrófilos nos sítios de infecção ou dano (ALVES-FILHO et al., 2009; LIU et al., 2012b). Um dos primeiros passos da cascata de ativação de neutrófilos, se dá pelo rolamento, que é mediado pela interação dos receptores PSGL-1 e CD44 nos neutrófilos com selectinas nas células endoteliais ativadas. Essas interações receptor-ligante pode iniciar a ativação de vias intracelulares nos neutrófilos, resultando na ativação das integrinas $\beta 2$ e $\alpha 4$. A interação das selectinas resulta na mudança de conformação da integrina $\beta 2$, e ao mesmo tempo, as quimiocinas ativam ainda mais os neutrófilos, mediado pela cascata de sinalização do receptor acoplado à proteína G (GPCR), como a sinalização através do receptor CXCR2. Isto resulta na mudança de conformação da integrina $\beta 2$ e adesão firme do neutrófilo mediado por essa integrina. Os neutrófilos aderentes rastejam para os locais de extravasamento, um passo mediado pela integrina antígeno do macrófago 1 (Mac-1) nos neutrófilos. Em seguida, acontece a transmigração do neutrófilo, uma etapa que requer os sinais-guia gerados pelo gradiente de quimiocinas CXCL1 e CXCL2. Assim, os neutrófilos tornam-se capazes de responder eficientemente aos estímulos provenientes do sítio de infecção no tecido (Figura 1) (MARGRAF; LEY; ZARBOCK, 2019; SÔNEGO et al., 2016; STADTMANN; ZARBOCK, 2012; ZEMANS; COLGAN; DOWNEY, 2009).

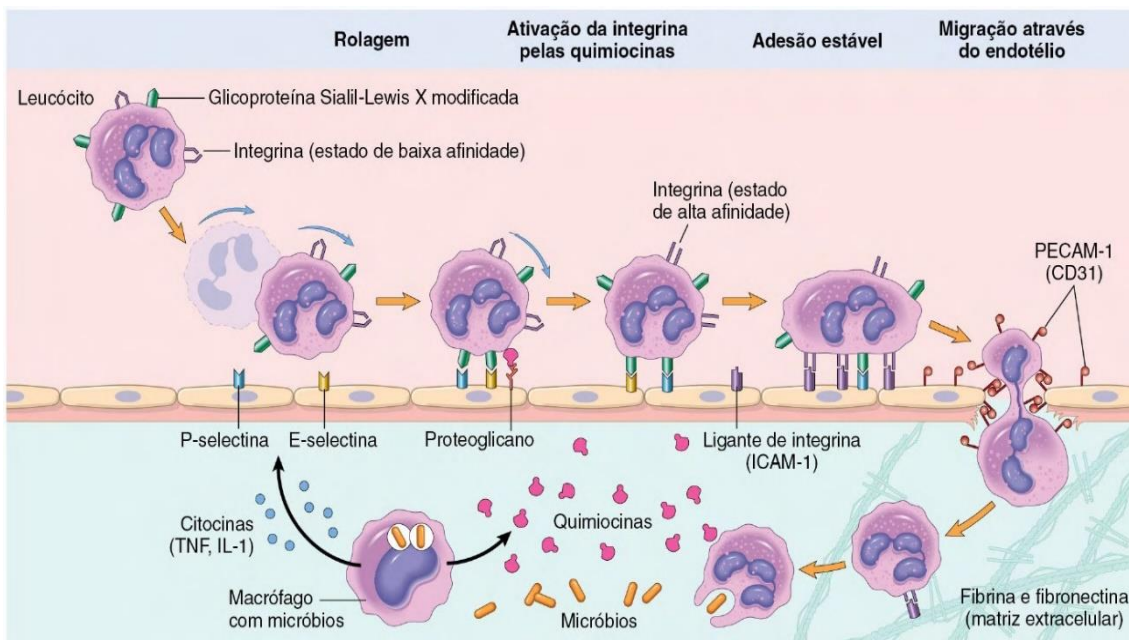


Figura 1. Representação esquemática dos eventos da cascata de ativação e migração de neutrófilos para o tecido. O processo de migração de neutrófilos requer interações entre essas células e as células endoteliais por múltiplas etapas. Macrófagos estimulados induzem a produção de citocinas que ativam as células endoteliais a produzir selectinas, ligantes de integrinas e quimiocinas. As quimiocinas são apresentadas na superfície endotelial e, após a ligação com seus receptores presentes nos neutrófilos, induzem a ativação das integrinas a um estado de ligação de alta afinidade e mediando a adesão firme de leucócitos. Em seguida, ocorre a migração do leucócito através da parede da vênula. Fonte: <https://studentconsult.inkling.com/read/cellular-and-molecular-immunology-abbas-7th/chapter-3/chapter-3-presentation-slides#2>

Além da ativação do GPCR, as moléculas quimioatraentes também promovem a fosforilação dos seus receptores pelas proteínas GPCR quinases (GRKs). Esta fosforilação permite que os receptores interajam com arrestinas, prevenindo que a sinalização via GPCRs aconteça, processo chamado de dessensibilização (STADTMANN; ZARBOCK, 2012). Além disso, existem proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs), incluindo P38 e ERK que, quando ativadas, interferem na atuação das GRKs, que por sua vez, afetam a migração de neutrófilos. Dessa forma, enquanto a expressão de P38 favorece a migração, pelo bloqueio da proteína GRK2, a proteína ERK inibe a migração, pela potencialização e ativação da proteína GRK2 (LIU et al., 2012b; TAN et al., 2020).

7.2 Imunometabolismo

O controle e a regulação das funções e da diferenciação das células sofrem grande influência da sua própria programação metabólica. A reprogramação metabólica pode ser descrita como mudanças na quantidade e nos tipos de nutrientes que são captados pelas células, bem como os processos metabólicos em que eles são utilizados. O imunometabolismo se refere à reprogramação metabólica que ocorre nas células do sistema imune durante a resposta inflamatória (MAKOWSKI; CHAIB; RATHMELL, 2020; MOREL, 2017; RUSSELL; HUANG; VANDERVEN, 2019).

Assim como todas as outras células, as células do sistema imune também usam vias de metabolismo energético para a produção de ATP e suporte de suas funções energéticas de sobrevivência e síntese de metabólitos intermediários, o que permite o crescimento e proliferação celular. Três vias de metabolismo integradas desempenham o papel de cumprir essas demandas bioenergéticas, são elas a glicólise, o ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA) (ou ciclo de Krebs ou ciclo do ácido cítrico) e a fosforilação oxidativa (OXPHOS). Enquanto a glicólise ocorre no citosol, o ciclo TCA e a OXPHOS acontecem na mitocôndria. A glicólise começa com a captação de glicose do meio externo através dos transportadores de glicose, seguida pela quebra da glicose-6-fosfato em piruvato e ácido pirúvico, que culmina na geração de 2 moléculas de ATP e na redução de NAD⁺ a NADH. O ciclo TCA, que ocorre na matriz mitocondrial, consiste na conversão de acetil-coA a citrato, que é quebrado e resulta na produção de 2 moléculas de ATP e nas moléculas energéticas NADH e FADH₂. Essas moléculas vão passar por um processo para transferir sua energia na cadeia respiratória e produzir de 30 a 36 moléculas de ATP (AL-KHAMI; RODRIGUEZ; OCHOA, 2017a) (Figura 2).

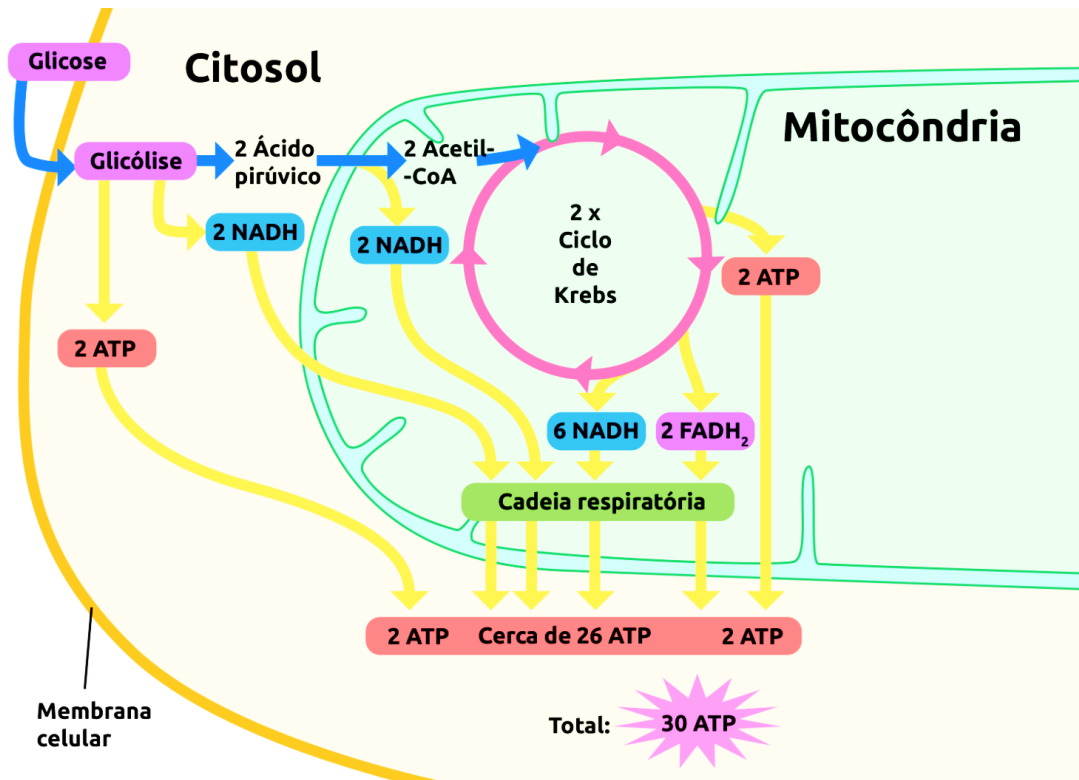


Figura 2. Representação esquemática das vias de metabolismo energético. As células produzem ATP, a molécula energética, usando três vias principais que são interconectadas, a glicólise, o ciclo do ácido cítrico e a fosforilação oxidativa. Fonte: <https://blog.biologiatotal.com.br/respiracao-celular-tudo-o-que-voce-precisa-saber/>

Os leucócitos respondem aos estímulos do meio externo com uma rápida proliferação e diferenciação em células efetoras altamente especializadas. Todos esses processos requerem uma grande demanda energética, não só pelo aumento da captação de nutrientes, como glicose, ácidos graxos e glutamina, mas também com a troca por vias de metabolismo especializadas que correspondem a certas funções efetoras (AL-KHAMI; RODRIGUEZ; OCHOA, 2017b; MAKOWSKI; CHAIB; RATHMELL, 2020). Por exemplo, o metabolismo glicolítico nas células imunes é tipicamente relacionado com a ativação de um fenótipo efetor, como células T efetoras, macrófagos M1, células dendríticas, células NK e linfócitos B, enquanto o metabolismo oxidativo de lipídeos e aminoácidos levam a um fenótipo regulador ou de memória (MAKOWSKI; CHAIB; RATHMELL, 2020).

Como já mencionado, os neutrófilos são fagócitos que exercem sua função a partir de algumas estratégias principais: fagocitose, *killing* microbiano, degranulação e NETosis. A formação de ROS é também importante para o desencadeamento dessas

atividades. As vias metabólicas utilizadas pelos neutrófilos e seus intermediários são fundamentais para que esta célula desempenhe o seu papel durante a infecção. Estudos sugerem que os neutrófilos contam quase que exclusivamente com a glicólise para suprir suas demandas energéticas. Na produção de ROS, receptores de membrana ativam vias de sinalização que promovem a entrada de glicose para a célula, através dos transportadores Glut1 da membrana, e aumentam o consumo de oxigênio pela célula (ALKHAMI; RODRIGUEZ; OCHOA, 2017b).

Uma característica importante dessas vias metabólicas é a sua plasticidade, já que dependendo da quantidade de energia necessária para uma função fisiológica e a rapidez com que essa energia precisa ser produzida, há a alternância entre essas vias. O aumento da demanda pela glicólise acentua a captação de glicose e depende da regulação positiva do transportador transmembrana e do aprisionamento intracelular de glicose (GLUT1 e HK-1 e 2, respectivamente). Por outro lado, quando OXPHOS está elevada há também o aumento do potencial de membrana mitocondrial, o que regula positivamente a expressão de genes relacionados à biogênese mitocondrial, como por exemplo o gene da DNA polimerase gama mitocondrial (PLG); do fator de transcrição mitocondrial (TFAM); e do co-ativador gama de receptores ativados por proliferador do peroxissomo (PGC-1 α) (SHEN et al., 2015). A OXPHOS também aumenta a taxa de consumo de oxigênio (OCR), enquanto a glicólise aumenta as taxas de acidificação extracelular (ECAR) (LOPES et al., 2018).

Estudos *in vitro* reforçam a hipótese de que a eficiência e a plasticidade das vias metabólicas são críticas na modulação das respostas inflamatórias. A ativação de macrófagos e células dendríticas por estímulos pró-inflamatórios, como IFN γ , faz com que essas células passem por uma mudança metabólica voltada à glicólise em vez de OXPHOS (KELLY; O'NEILL, 2015). Em contrapartida, macrófagos alternativamente ativados requerem uma mudança metabólica oposta. Por exemplo, a citocina IL-4, causa o aumento da produção de ATP por OXPHOS e o bloqueio desta via impede a ativação alternativa de macrófagos (VAN DEN BOSSCHE et al., 2016). Nos anos 80, outros experimentos *in vitro* mostraram que a ativação de neutrófilos por lipopolissacarídeo (LPS) aumenta o consumo de glicose. Além disso, também foi demonstrado que os neutrófilos estimulados por LPS aumentam OCR, com desacoplamento mitocondrial, sendo esse oxigênio usado para produzir ROS, que é essencial para as funções microbicidas dessas células (GUTHRIE et al., 1984). No entanto, o papel das trocas

metabólicas em neutrófilos *in vitro*, durante seu recrutamento e na resolução da inflamação ainda é desconhecido.

Apesar de existir algum avanço no conhecimento das vias metabólicas responsáveis pela função das células do sistema imune, o imunometabolismo é uma área de conhecimento recente, e ainda há muitas lacunas, principalmente em relação aos neutrófilos.

7.3 Metodologia

7.3.1 Isolamento de neutrófilos da medula óssea

Camundongos C57BL/6 de 8 a 10 semanas foram eutanasiados e tiveram seus ossos fêmur e tíbia retirados para coleta da medula óssea. Para isso, as epífises foram cortadas e foram injetados, pelas extremidades, 3 mL de RPMI. A suspensão celular obtida foi submetida à centrifugação à 400 x g durante 8 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em meio RPMI ou Percoll® 52%. A separação de neutrófilos foi feita por centrifugação a 400 x g por 30 minutos a 4°C, em gradiente de densidade usando Histopaque® 1119-1 e 1077-1 ou gradiente de Percoll® 52%, 64% e 72% em PBS 1x. As hemácias foram lisadas pela adição de água seguida pela adição de PBS 10x, na proporção de 9:1. Os neutrófilos foram contados em câmara de Neubauer. A pureza dos neutrófilos em todos os experimentos foi acima de 80%.

7.3.2 Exposição de neutrófilos ao etanol *in vitro* e ensaio de viabilidade celular

Os neutrófilos (5×10^5 células) foram plaqueados em placas de 96 poços, tratados com etanol determinadas concentrações de etanol (50, 100, 175 e 525 mM) diluído em RPMI e mantidos em estufa a 37°C com 5% de CO₂ por 3 h. A viabilidade celular foi verificada usando a medida de lactato desidrogenase (LDH) (Bioclin, Brasil) para acessar a citotoxicidade induzida por drogas. O ensaio foi realizado de acordo com as instruções do fabricante.

7.3.3 Ensaio de fagocitose

A partir da incubação dos neutrófilos expostos *in vitro* com 100 mM de etanol, dois ensaios de fagocitose foram realizados: o primeiro por incubação das células com conídios de *A. fumigatus* (MOI 5:1) por 3h a 37°C com 5% de CO₂ e o segundo com partículas de zimosan A (MOI 5:1) provenientes de *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma) por 1 hora a 37°C com 5% de CO₂. Após, foram realizadas as preparações de lâminas de cytospin e coloração com o *kit* de Panótico rápido. O índice fagocítico foi avaliado pela contagem de conídios ou partículas dentro de neutrófilos

7.3.4 Imunofluorescência

Após a exposição de neutrófilos ao etanol *in vitro*, a expressão e a internalização de CXCR2 nos neutrófilos foi avaliada por imunofluorescência. Brevemente, os neutrófilos incubados com etanol *in vitro* e estimulados com zimosan foram colocados em preparações de lâminas de cytospin e fixados com formaldeído 4%. As amostras foram permeabilizadas com triton X-100 1%. Posteriormente, houve a marcação das células com DAPI (Thermo Fisher), com o anticorpo primário CXCR2 (Merck) e o anticorpo secundário Alexa 488 (Merck). As preparações foram visualizadas em microscópio de fluorescência (Nikon) usando o *software* NIS-Elements e a quantificação da intensidade de fluorescência foi feita usando o programa ImageJ.

7.3.5 Ensaio de quimiotaxia

O ensaio de quimiotaxia de neutrófilos em resposta a N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP) foi feito utilizando câmara de Boyden. Neutrófilos provenientes da medula óssea foram isolados conforme descrito na seção anterior. Após o período de incubação com etanol (100 mM), as células foram ressuspensas em meio RPMI. O quimioatraente fMLP (1 µM), diluído em RPMI ou o controle negativo foi adicionado no aparato inferior da câmara. Entre os aparatos inferior e superior, foi colocada uma membrana de policarbonato com poros de 5-µm (Neuro Probe). As células foram adicionadas na concentração de 1×10^5 por poço na parte superior e a câmara foi incubada para permitir a migração celular em estufa a 37°C com 5% de CO₂ por 60 min. Depois da incubação, a membrana foi retirada da câmara e corada com hematoxilina. Cada área

associada a um poço foi contada usando o microscópio de luz, para contar as células migratórias presentes em 6 campos aleatórios. Os resultados foram expressos como o número de neutrófilos migrados por campo.

7.3.6 Citometria de fluxo

Expressão de CXCR2. Para avaliação da expressão de CXCR2 dos neutrófilos expostos *in vitro* ao etanol, as células foram ressuspensas em tampão para citometria de fluxo (2mM EDTA, 2 mM de NaN₃, 2% de BSA e PBS 1x). Em seguida, foram centrifugadas a 1200 rpm por 7 min a 4°C, incubadas com Ly6G conjugado com piridina de clorofila (PerCP) e-Fluor710 (Thermo Fisher), durante 30 min a 4°C na ausência de luz. Após esse período, as células foram fixadas com formaldeído 4%, lavadas com o tampão de citometria de fluxo e permeabilizadas com 0,1% de triton x-100 em PBS 1x. Após nova lavagem, houve a marcação com o anticorpo primário CXCR2 (Merck) e o anticorpo secundário Alexa 488 (Merck), assim como os anticorpos utilizados como controle, durante 30 minutos a 4°C no escuro.

Captação de glicose. Os neutrófilos expostos *in vitro* ao etanol foram ressuspensos em tampão para citometria de fluxo e incubados com um análogo de glicose fluorescente, o 2-Deoxy-2-[(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]-D-glucose (2NBDG) (Peprotech), em estufa a 37°C com 5% de CO₂ por 30 min. Após esse período, as células foram lavadas com o tampão de citometria de fluxo e fixadas com formaldeído 4%. Posteriormente, houve a marcação com Ly6G conjugado com PerCP-e-Fluor710 a 4°C por 30 min na ausência de luz. A captação de glicose também foi feita adicionando D-glicose nos poços seguida de medição usando glicosímetro. As amostras foram analisadas pela leitura em citômetro de fluxo Attune NxT Flow Cytometer (ThermoFisher Scientific), e analisadas com auxílio do programa FlowJo X (TreeStar Inc., Ashland, OR). As células foram analisadas pela porcentagem de células positivas e intensidade de fluorescência para seleção das populações celulares. Os limites para cada quadrante de marcadores foram sempre analisados baseando-se nas populações negativas e nos isotipos controles.

7.3.7 Western blot

A expressão de pP38 e pERK 1/2 nos neutrófilos expostos *in vitro* ao etanol, e estimuladas com diferentes concentrações de CXCL1, foi avaliada por Western Blot. Inicialmente, foi realizada a extração de proteínas presentes nas células. Para tanto, foi adicionado sobre o *pellet* de células (aproximadamente 5×10^5 células), 50 uL de tampão RIPA para lise de células (0,81% de Triton x-100; 2 mM de NaVO_3 ; 20 mM de $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$; 50 mM de NaF; Suplemento completo 1x; 1 mM de PMSF). As amostras foram centrifugadas a 9.300 g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi reservado em outro tubo e a dosagem de proteínas foi feita utilizando o método de Bradford (BRADFORD, 1976). O equivalente a 10 µg de cada amostra foram resolvidos em gel de poliacrilamida Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ Precast Gels (BioRad). A corrida ocorreu em uma voltagem constante de 200 V. Após o término da resolução do gel, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose. O aparato de transferência foi submetido a uma cuba, contendo Solução de Transferência (0,3% de Trizma base; 1,44% de Glicina; 20% de Metanol), e a transferência ocorreu em voltagem constante de 100V. Após a transferência, a membrana foi submetida a uma Solução de Bloqueio (5% de BSA em PBS 1x/Tween 0,1%), e deixada em agitação durante 1 hora. Após o período de incubação, a membrana foi lavada 3 vezes com solução de lavagem (PBS 1x/Tween 0,1%), e incubada com anticorpo primário anti-pP38 (Cell Signaling) ou anti-pERK 44/42 (Cell Signaling) na diluição 1:1000 em BSA 3%, *overnight* a 4°C. A membrana foi lavada 3 vezes com solução de lavagem e incubada com anticorpo secundário *goat-anti rabbit* (Cell Signaling), e deixada em agitação em temperatura ambiente durante 1 hora. Após a incubação, a membrana foi lavada por 30 minutos com solução de lavagem. A GAPDH foi utilizada como controle constitutivo. A revelação das bandas, provenientes das proteínas analisadas, foi realizada com o aparelho ChemiDoc™ Imagers - Western Blot Digital Imaging (BioRad). A membrana foi envolvida em um plástico e foi adicionado 1 mL do *kit Clarity Western ECL Substrate* e deixado agir durante 5 minutos. Posteriormente, o excesso da solução foi removido. A análise das proteínas foi feita comparando as bandas com o peso padrão (BioRad) e a densitometria das bandas foi feita com o uso do programa ImageJ.

7.3.8 Análise estatística

As análises estatísticas e a construção dos gráficos foram realizadas utilizando o software *GraphPad Prism* versão 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, EUA). As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram determinadas pela Análise de variância de uma via (One Way-ANOVA), seguida pelo método pós-teste de Tukey. Resultados envolvendo dois grupos experimentais foram analisados pelo teste t Student. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão. Todos os dados foram considerados estatisticamente significantes se $p < 0,05$.

7.4 Resultados

7.4.1 Padronização do tratamento *in vitro* com etanol

Inicialmente, foi feita uma padronização da quantidade de etanol para tratamento *in vitro*. Neutrófilos provenientes da medula óssea de camundongos C57BL/6J de aproximadamente 10 semanas foram incubados com as concentrações de etanol de 50, 100, 175 e 525 mM. A concentração mínima escolhida foi semelhante a que foi encontrada no sangue de camundongos após o consumo crônico de etanol, ou seja, 200 mg/dL, que equivale a aproximadamente 50 mM (Figura 1 do artigo científico - capítulo 2). O sobrenadante da cultura foi utilizado para avaliar a viabilidade celular, pela dosagem de lactato desidrogenase (LDH). Os resultados mostraram que neutrófilos expostos *in vitro* a etanol induziram citotoxicidade apenas na concentração de 525 mM (Figura 3).

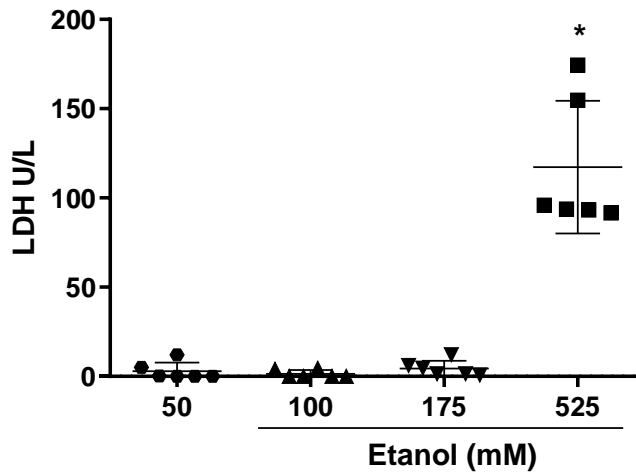


Figura 3. Viabilidade celular de neutrófilos expostos em diferentes concentrações de etanol. Neutrófilos provenientes da medula óssea de camundongos C57Bl/6J foram incubados por 3 horas com diferentes concentrações de etanol. O sobrenadante da cultura foi coletado e os níveis de LDH foram medidos por *kit* específico. Os resultados foram expressos como média \pm SD (n=5 a 6 poços por grupo). *Diferença significativa ($p < 0,05$).

Após, foi avaliada se a exposição de neutrófilos ao etanol foi capaz de causar algum efeito na capacidade fagocítica de neutrófilos. Dessa forma, neutrófilos da medula óssea foram expostos a concentrações de 100 mM de etanol por 3 horas. Em seguida essas células foram também incubadas com conídios de *A. fumigatus* (MOI 5:1) por 3h e o índice fagocítico foi determinado. Foi observado que os neutrófilos expostos a uma concentração de 100 mM de etanol tiveram uma redução significativa na fagocitose em comparação com células não expostas ao etanol (Figura 4).

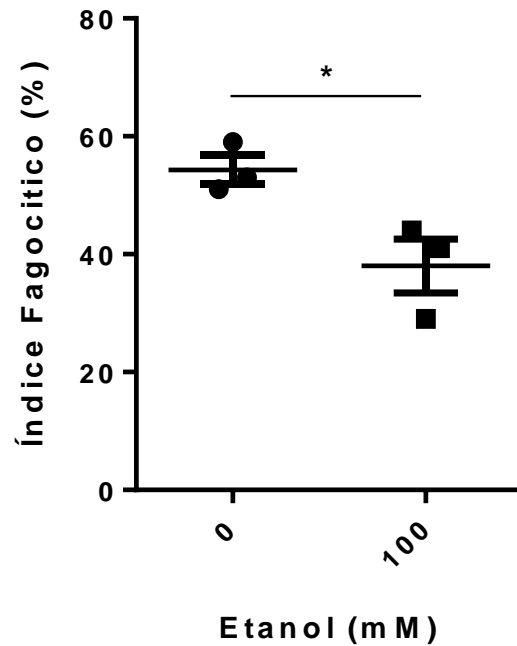


Figura 4. Capacidade fagocítica de neutrófilos expostos a diferentes concentrações de etanol. Neutrófilos provenientes da medula óssea de camundongos C57Bl/6J foram incubados por 3 horas com diferentes concentrações de etanol. Essas células foram novamente incubadas com conídios de *A. fumigatus* (MOI 5:1) por 3h e colocadas em preparações de citospin para a contagem de fagocitose. Os resultados foram expressos como média \pm SD (n=3 poços por grupo). *Diferença significativa ($p < 0,05$).

Além dos conídios de *A. fumigatus*, também foi realizado um ensaio de fagocitose, utilizando partículas de zimosan A. Dessa forma, neutrófilos da medula óssea foram expostos a concentrações de 100 mM de etanol por 3 horas. Em seguida essas células foram também incubadas com partículas de zimosan (MOI 5:1) por 1h e o índice fagocítico foi determinado. Foi observado que os neutrófilos expostos a uma concentração de 100 mM apresentaram capacidade fagocítica reduzida em comparação com células não expostas ao etanol (Figura 5).

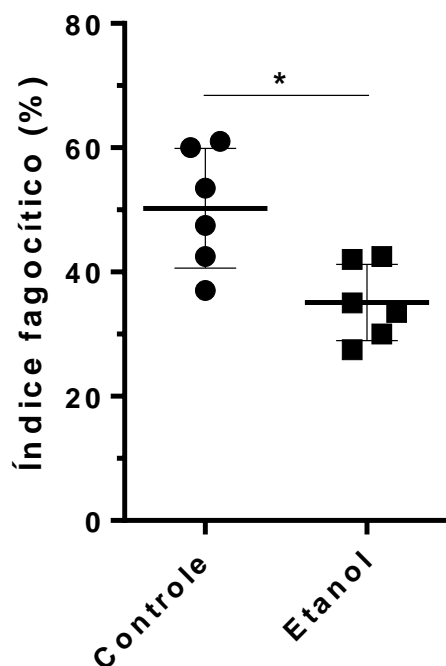


Figura 5. Neutrófilos expostos ao etanol fagocitam menos partículas de zimosan. Neutrófilos provenientes da medula óssea de camundongos C57Bl/6J foram incubados por 3 horas com diferentes concentrações de etanol. Essas células foram novamente incubadas com partículas de zimosan (MOI 5:1) por 1h e colocadas em preparações de citospin para a contagem de fagocitose. Os resultados foram expressos como média \pm SD (n=6 camundongos por grupo). *Diferença significativa ($p < 0,05$).

7.4.2 Quimiotaxia de neutrófilos

O movimento guiado de células em direção a um gradiente quimiotático distante, ou quimiotaxia, é essencial para os neutrófilos chegarem no local do estímulo inflamatório (PETRI; SANZ, 2018). A quimiotaxia de neutrófilos expostos ao etanol foi avaliada na câmara de Boyden em direção ao quimiotático fMLP. Dessa forma, neutrófilos provenientes da medula óssea de camundongos foram incubados com 100 mM de etanol por 3h. Em seguida, essas células foram colocadas na câmara de Boyden para ensaio de migração, por 60 minutos. Foi observado que fMLP foi capaz de induzir uma migração robusta de células, em comparação a células sem estímulo quimiotático. No entanto, os neutrófilos expostos ao etanol tiveram redução significativa na sua quimiotaxia em comparação as células não tratadas (Figura 6).

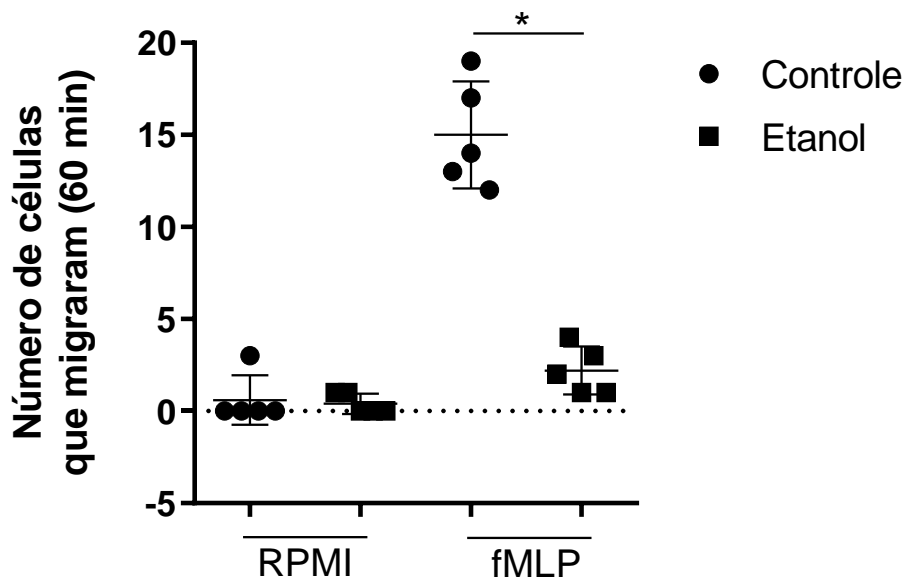


Figura 6. Neutrófilos expostos ao etanol têm sua quimiotaxia reduzida. Neutrófilos provenientes da medula óssea de camundongos foram incubados por 3 horas com etanol. Posteriormente essas células colocadas em câmara de Boyden para migrar em direção a fMLP por 60 min e a quantidade de células migradas foi contada. Os resultados foram expressos como média \pm SD (n=5 poços por grupo). *Diferença significativa ($p < 0,05$).

7.4.3 Expressão do receptor CXCR2

No intuito de avaliar se a falha de quimiotaxia nos neutrófilos expostos ao etanol estava relacionada com uma menor expressão e internalização do receptor CXCR2 nessas células, a presença de CXCR2 foi avaliada por dois ensaios diferentes: imunofluorescência e citometria de fluxo. Nas preparações de imunofluorescência, os neutrófilos foram incubados por 3h com etanol, e após, foram estimulados com zimosan na proporção de 5:1 e incubados por 1h. Em seguida, as células foram colocadas em lâminas por citospin. As amostras foram permeabilizadas e posteriormente incubadas com DAPI e os anticorpos específicos anticorpo para marcar CXCR2 e DAPI (Figura 7).

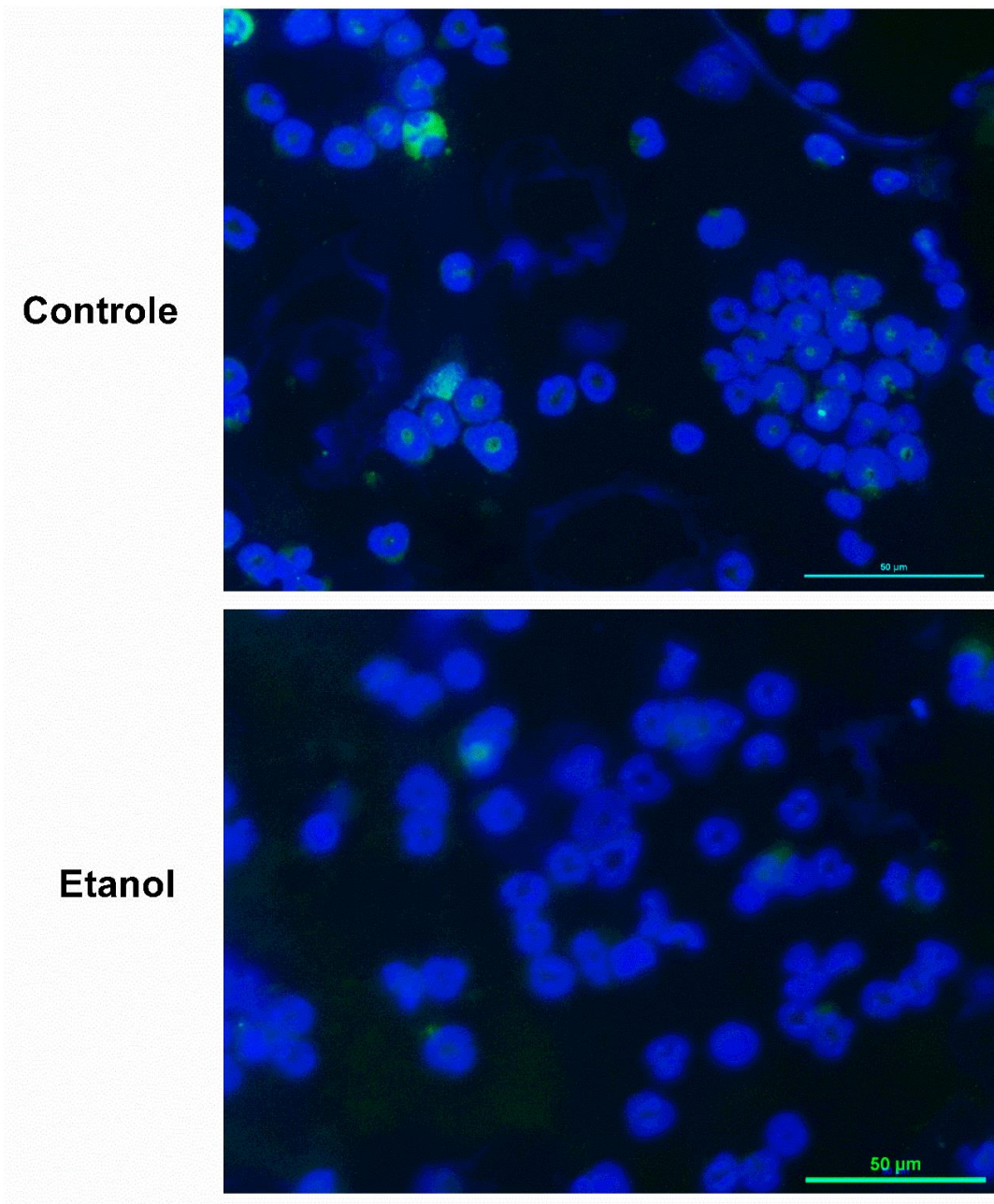


Figura 7. Imunofluorescência para expressão de CXCR2 em neutrófilos. Neutrófilos provenientes da medula óssea de camundongos foram incubados por 3 horas com etanol. Posteriormente essas células foram novamente incubadas com zimosan, colocadas em lâminas, permeabilizadas, fixadas, marcadas com DAPI (azul) e CXCR2 (verde) e avaliadas em microscópio de fluorescência (n=3 camundongos por grupo). As barras representam 50 μm .

Não foram observadas diferenças significativas na quantificação da intensidade de fluorescência de CXCR2 das lâminas. Em relação as amostras que foram permeabilizadas, ou seja, as que tiveram CXCR2 marcado dentro das células, também não mostrou nenhuma alteração na expressão de CXCR2 nas células expostas ao etanol em comparação com o controle (Figura 8).

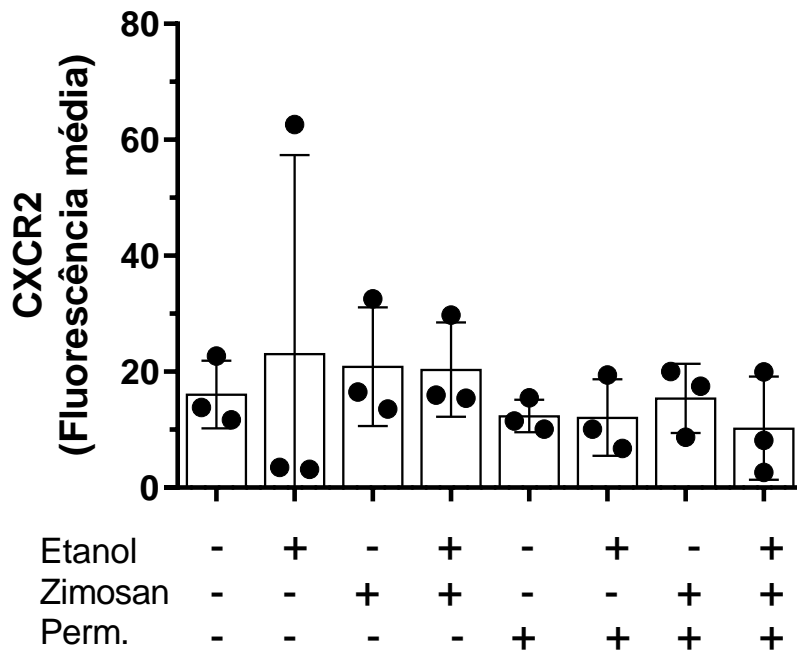


Figura 8. Quantificação da intensidade de fluorescência para a marcação de CXCR2 em neutrófilos. Neutrófilos da medula óssea de camundongos foram incubados com etanol. Posteriormente foram também estimuladas com zimosan, colocadas em lâminas, e marcadas com DAPI e CXCR2. As lâminas foram avaliadas por microscópio de fluorescência e fotos de cada amostra foram tiradas e a intensidade de fluorescência foi medida. Os resultados foram expressos como média \pm SD (n=3 camundongos por grupo).

A expressão de CXCR2 também foi avaliada por citometria de fluxo. Neutrófilos da medula óssea, após incubação com etanol, foram estimulados com CXCL1, marcados com anticorpos específicos para Ly6G e CXCR2 e avaliados em citômetro de fluxo. Após a estratégia de análise aplicada (Figura 9A), não foram observadas diferenças tanto na porcentagem de neutrófilos presentes nas amostras quanto na porcentagem de células expressando Ly6G e CXCR2 (Figura 9B e C). No entanto, quando avaliada a intensidade de fluorescência média de CXCR2, as células incubadas com etanol apresentaram diminuição significativa da expressão de CXCR2 intracelular, em comparação as células não tratadas, sugerindo uma menor capacidade de internalização desse receptor nos neutrófilos após exposição ao etanol. (Figura 9D).

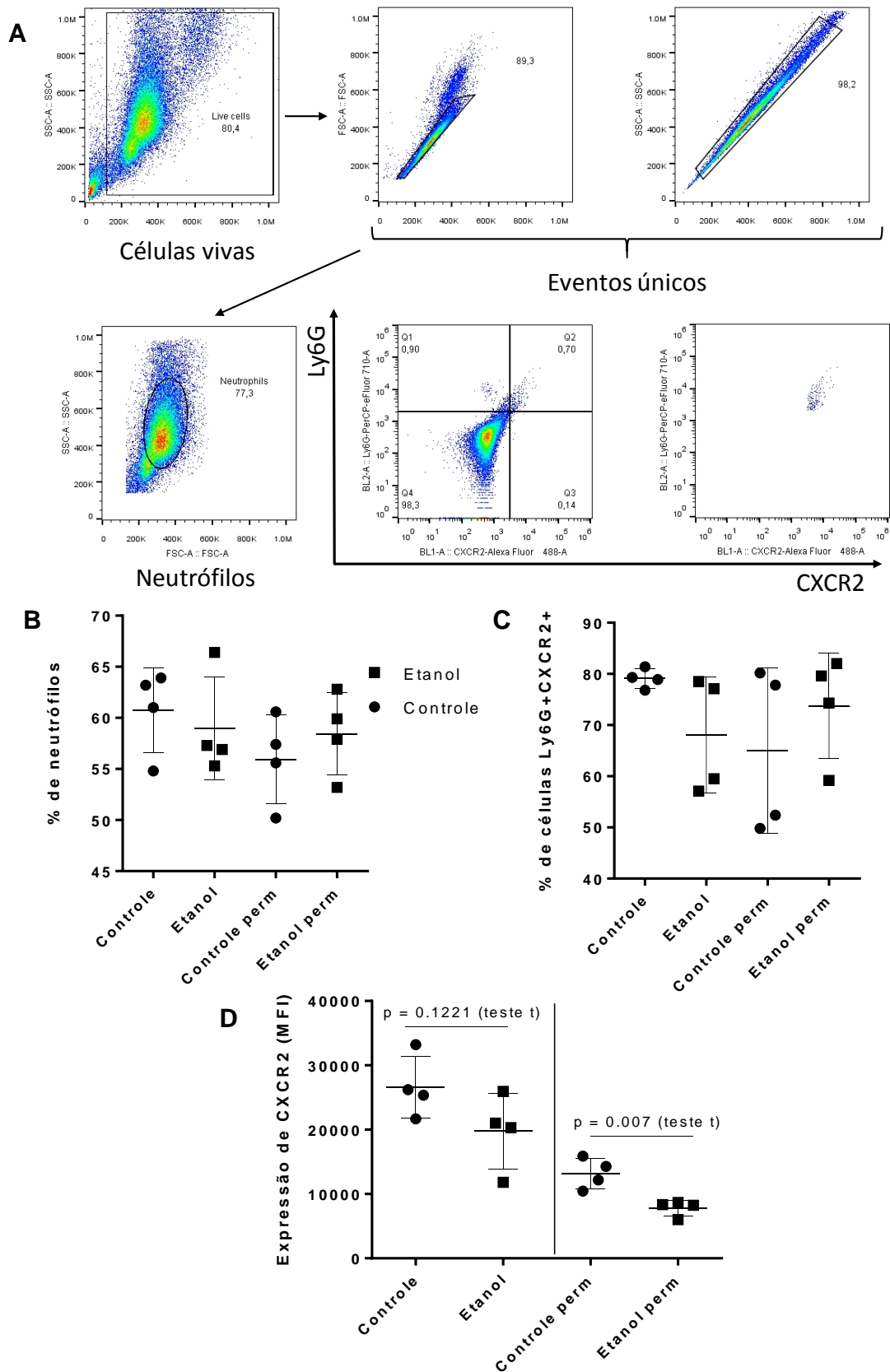


Figura 9. Diminuição da expressão de CXCR2 em neutrófilos expostos a etanol. Neutrófilos provenientes da medula óssea de camundongos foram incubados por 3 horas com etanol. Posteriormente essas células foram novamente estimuladas com CXCL1, permeabilizadas, fixadas, marcadas para Ly6G e CXCR2 e lidas em citômetro de fluxo. Os resultados foram

expressos como média \pm SD (n=4 camundongos por grupo). (A) Estratégia de análise. (B) Porcentagem de neutrófilos. (C) Porcentagem de células positivas para Ly6G e CXCR2. (D) Expressão de CXCR2 na superfície e intracelular. *Diferença significativa ($p < 0,05$).

7.4.4. Expressão de proteínas relacionadas à migração de neutrófilos

Como mencionados, algumas proteínas MAPKs possuem funções bem conhecidas em relação a migração de neutrófilos. Dessa forma, foi avaliada por Western Blot, a expressão de pP38 e de pERK 1/2, provenientes de neutrófilos expostos a etanol e estimulados com três diferentes concentrações de CXCL1, sendo elas 3, 10 e 30 ng/mL por 4h.

Para a expressão da proteína pP38, os resultados mostraram que, para os neutrófilos não expostos ao etanol, não foram observadas diferenças na expressão de pP38 após estímulo com 3 e 10 ng/mL de CXCL1. Quando essas células são estimuladas com 30 ng/mL de CXCL1, há o aumento da expressão de pP38. Nos neutrófilos expostos ao etanol, não foi observado um padrão de concentração-resposta após o estímulo por CXCL1, sendo que a concentração que induziu a maior expressão de pP38 foi a concentração intermediária, de 10 ng/mL (Figura 10).

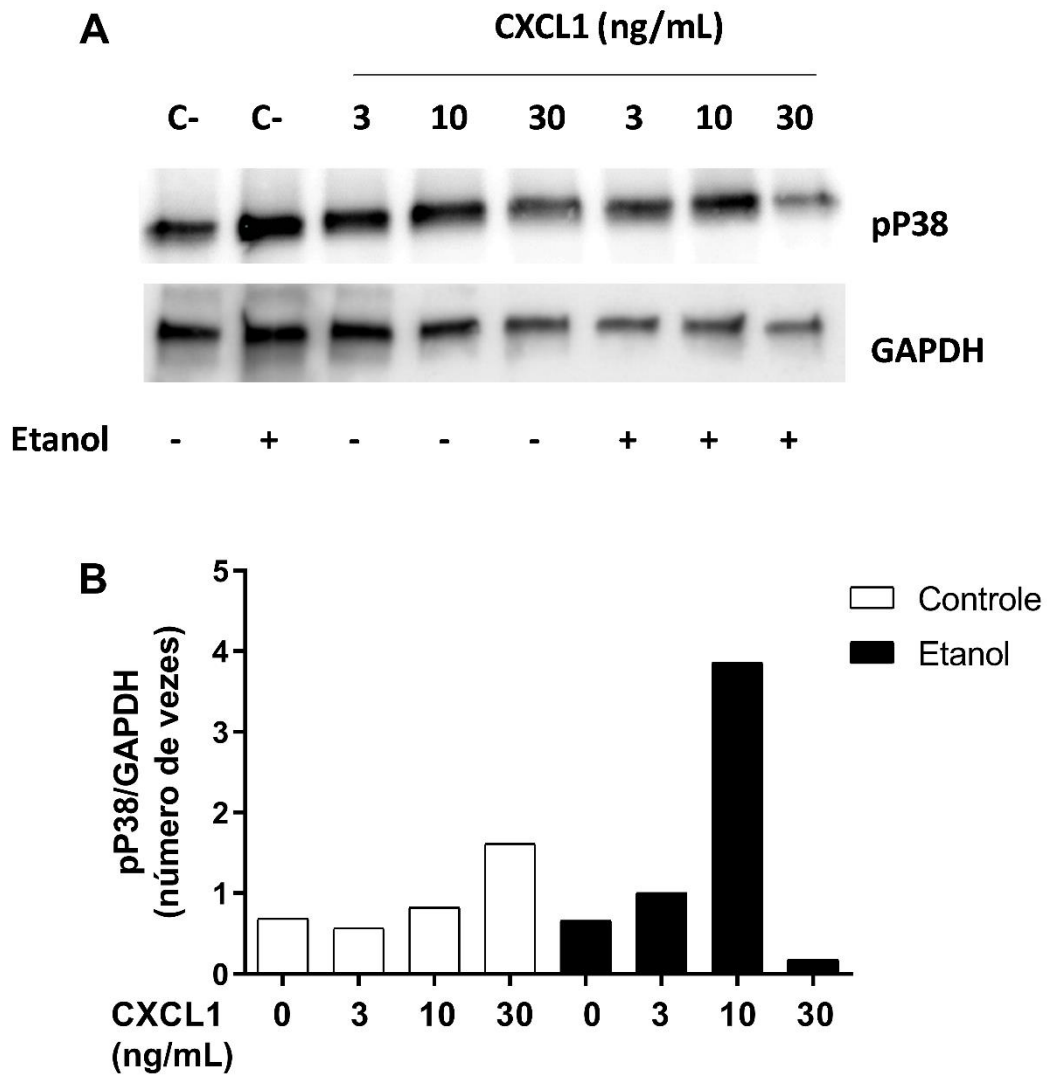


Figura 10. Expressão da proteína pP38 em neutrófilos expostos a etanol. Neutrófilos provenientes da medula óssea de camundongos foram incubados por 3 horas com etanol. Posteriormente essas células foram novamente estimuladas com CXCL1, e suas proteínas foram extraídas para avaliação da expressão de pP38 por Western Blot. Os grupos experimentais estão demonstrados na figura. A proteína GAPDH foi utilizada como controle de expressão constitutivo (A) e a quantificação das bandas foi feita por densitometria pelo uso do programa ImageJ (B).

Em relação a proteína pERK 1/2, foi observado que para os neutrófilos não expostos ao etanol não houve aumento significativo da sua expressão após estímulo com CXCL1. No entanto, para os neutrófilos expostos ao etanol, foi observado uma relação de concentração-resposta após o estímulo com as diferentes concentrações de CXCL1. (Figura 11).

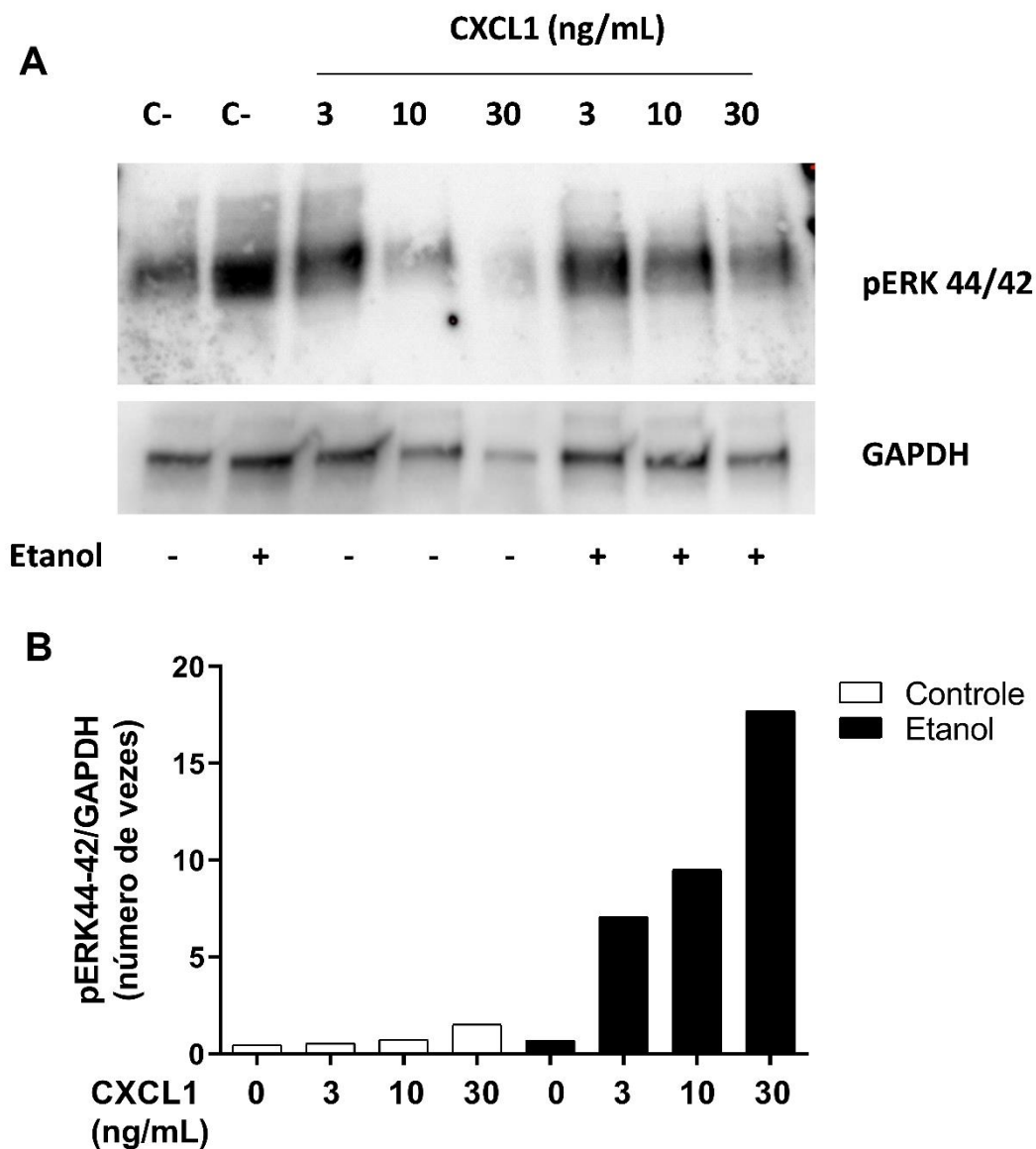


Figura 11. Expressão da proteína pERK 1/2 em neutrófilos expostos a etanol. Neutrófilos provenientes da medula óssea de camundongos foram incubados por 3 horas com etanol. Posteriormente essas células foram novamente estimuladas com CXCL1, e suas proteínas foram extraídas para avaliação da expressão de pERK 1/2 por Western Blot. Os grupos experimentais estão demonstrados na figura. A proteína GAPDH foi utilizada como controle de expressão constitutivo (A) e a quantificação das bandas foi feita por densitometria pelo uso do programa ImageJ (B).

7.4.5 Captação de glicose pelos neutrófilos

Recentemente, um novo campo de conhecimento tem surgido na literatura, o imunometabolismo, que é a relação entre o metabolismo celular de células do sistema imune bem como a correlação com as funções efetoras dessas células. No caso dos neutrófilos, o que se sabe é que essas células contam quase que exclusivamente com a glicólise para exercer e regular suas funções (TAN et al., 2020). Dessa forma, este trabalho buscou avaliar se o presente modelo de exposição de neutrófilos a etanol, *in vitro*, seria capaz de alterar o metabolismo de glicose por essas células. Para isso, foi utilizado um análogo fluorescente de glicose, o 2NBDG (2-desoxi-2-((7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4- il)amino). Neutrófilos previamente expostos ao etanol foram incubados com 2NBDG por 30 minutos a 37°C com 5% de CO₂, marcados com Ly6G e avaliados por citometria de fluxo. A estratégia de análise utilizada consistiu primeiramente pelo isolamento da população de neutrófilos (mesma estratégia da Figura 18A), seguida da delimitação das células negativas e positivas para 2NBDG a partir dos controles experimentais negativos (Figura 12A). Os dados obtidos mostraram que a porcentagem de células Ly6G⁺ não variou após exposição ao etanol e incubação com o análogo de glicose 2NBDG (Figura 12B). No entanto, também não foram observadas diferenças significativas entre os grupos de células Ly6G⁺2NBDG⁺ e também em relação a intensidade média de fluorescência de 2NBDG nas células Ly6G⁺ (Figura 12C e D).

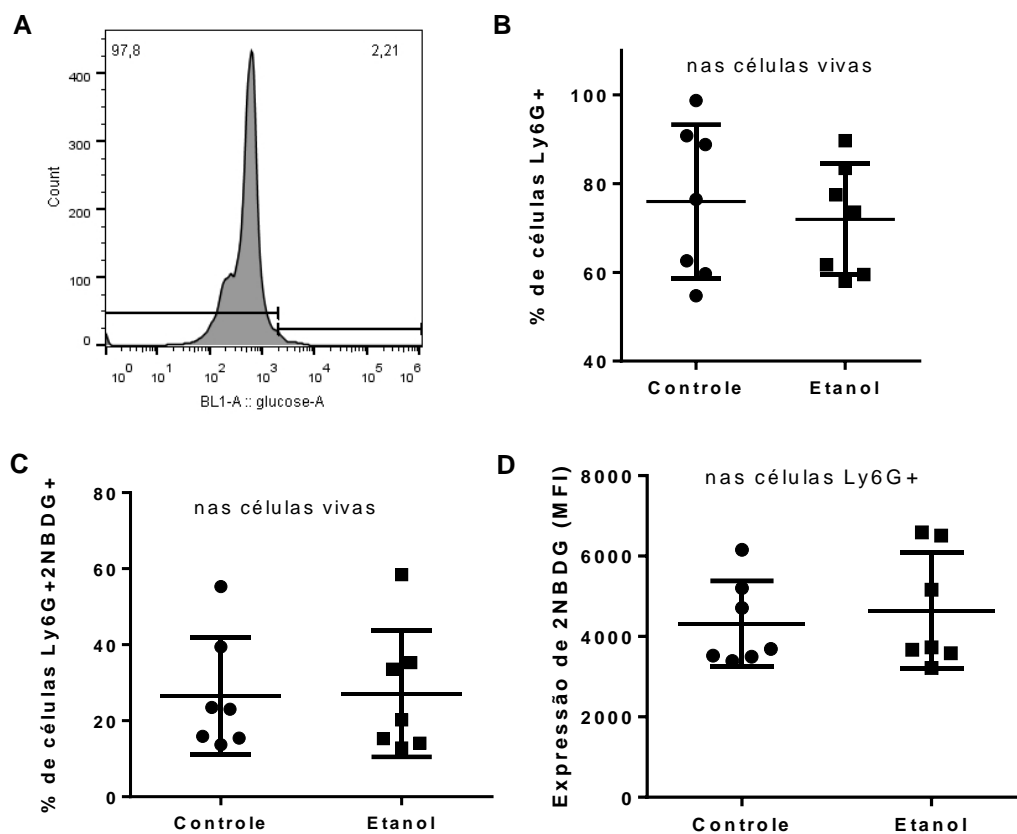


Figura 12. Captação de 2NBDG por neutrófilos expostos a etanol. Neutrófilos provenientes da medula óssea de camundongos foram incubados por 3 horas com etanol. Posteriormente essas células incubadas com 2NBDG por 30 min a 37° e depois marcadas para Ly6G e lidas em citômetro de fluxo. Os resultados foram expressos como média \pm SD (n=7 camundongos por grupo). (A) Estratégia de análise. (B) Porcentagem de células Ly6G+. (C) Porcentagem de células Ly6G+2NBDG+. (D) Expressão de 2NBDG.

8 CAPÍTULO 5 – O EFEITO DO CONSUMO CRÔNICO DE ETANOL NA COMPOSIÇÃO BACTERIANA DA MICROBIOTA INTESTINAL

8.1 Efeitos do consumo de etanol na microbiota

A microbiota intestinal é o conjunto de todos os microrganismos presentes no trato gastrointestinal (TGI). A microbiota contém dezenas de trilhões de microrganismos, que vivem em simbiose com o TGI e conta com mais de 1000 espécies diferentes já conhecidas, sendo que a maioria delas pertencem aos filos *Firmicutes* e *Bacteroidetes* (CARR; CHILL; MAIDA, 2002; GONÇALVES et al., 2016; HOOPER; LITTMAN; MACPHERSON, 2012).

Evidências revelaram que a ruptura da homeostase da microbiota intestinal (disbiose), tem sido associada com a incidência de várias doenças, sendo elas locais ou não (ZHANG et al., 2020). Dentre elas, pode-se citar a doença inflamatória intestinal (IBD), a síndrome do intestino irritável, doença celíaca, infecções, alergias alimentares, asma, diabetes, obesidade, esclerose múltipla, autismo, câncer do cólon e do reto e periodontite diabetes do tipo 1 e do tipo 2, obesidade, e doenças cardiovasculares (BULL-OTTERSON et al., 2013; DE TIMARY et al., 2015; ENGEN et al., 2015; KAMADA et al., 2013; LECLERCQ et al., 2017).

A microbiota impacta profundamente o fenótipo e a função o sistema imune do hospedeiro (AHERN; MALOY, 2020). Animais isentos de germes apresentam inúmeras deficiências em seu sistema imune, como por exemplo, o impedimento da diferenciação e acúmulo de linfócitos T no intestino, que é revertido pelo transplante de microbiota fecal (YU et al., 2020). Há também uma relação co-evolutiva entre a microbiota e o sistema imune dos mamíferos, o que confere um fator crucial na manutenção e regulação da homeostase do hospedeiro. Portanto, alterações na composição da microbiota normal, ou disbiose, podem influenciar negativamente a fisiologia do hospedeiro, e predispor a diversas doenças (HOOPER; LITTMAN; MACPHERSON, 2012). O entendimento da base molecular dessas interações microbiota-hospedeiro podem prover bases para o desenvolvimento de agentes que configuram a função imunológica de maneira que seus alvos possam beneficiar o hospedeiro (AHERN; MALOY, 2020; ENAUD et al., 2020).

Uma dieta com grande consumo de álcool é também um possível evento desencadeador de disbiose da microbiota intestinal. Considerando o metabolismo de

etanol, a mucosa intestinal tem um papel muito importante, já que a superfície epitelial é a responsável por incorporar o etanol na circulação por difusão passiva. Esse metabolismo corresponde a aproximadamente 80% de toda a absorção do álcool (DE TIMARY et al., 2015).

Um estudo feito por Bala e colaboradores (2014) mostrou os efeitos da ingestão aguda de álcool na homeostase intestinal de indivíduos saudáveis. Uma hora após a ingestão de 0,06 g de etanol por kg de peso corpóreo em um volume total de 300 mL de suco de laranja ou morango, foram observados altos níveis de etanol no soro (cerca de 90 mg/dL). Essa grande quantidade de álcool circulante foi correlacionada com uma grande quantidade de DNA bacteriano presente no soro destes indivíduos. Além disso, também foi observado que endotoxinas, produtos do metabolismo de bactérias gram-negativas aumentaram no soro após 30 minutos de ingestão de álcool e se mantiveram alta por até 3 horas após a ingestão, sugerindo que mesmo em episódios de intoxicação aguda por etanol, podem ocorrer alterações na integridade do epitélio intestinal e, conseqüentemente, liberação do conteúdo intestinal na circulação. No entanto, o mecanismo exato pelo qual o álcool aumenta a permeabilidade intestinal ainda não é bem elucidado (BALA et al., 2014).

Samuelson e colaboradores (2017) investigaram a relação entre disbiose mediada pelo consumo de etanol e a resposta imune contra *Klebsiella pneumoniae*. Neste estudo, os autores depletaram a microbiota de camundongos utilizando um coquetel de antibióticos e depois recolonizaram a microbiota do TGI usando transplante fecal proveniente de camundongos que tiveram uma dieta com etanol ou de camundongos que beberam uma solução isocalórica (controles). Os animais que receberam o transplante fecal proveniente de camundongos com a dieta com etanol álcool apresentaram maior susceptibilidade à infecção por *K. pneumoniae*, quando comparados com os animais recolonizados com a microbiota dos controles. Além disso, a maior susceptibilidade foi associada também com um aumento na concentração de citocinas inflamatórias e na diminuição no número de células T CD4+ e CD8+ nos pulmões e uma maior concentração dessas células no intestino após a infecção bacteriana, o que sugere que a disbiose causada pela dieta com etanol pode ser capaz de sequestrar esses linfócitos para o intestino e impedir a migração destes para os pulmões (SAMUELSON et al., 2017).

Todas essas evidências mostram cada vez mais que a microbiota intestinal interfere na interação patógeno-hospedeiro, por sua influência em mecanismos de

imunorregulação, inflamação, metabolismo e outros processos fisiológicos dentro e fora do trato gastrointestinal. Dessa forma, avaliar como determinada doença ou dieta altera a composição da microbiota pode ser uma estratégia terapêutica promissora.

8.2 Metodologia

8.2.1 Animais experimentais

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

8.2.2 Modelo de alcoolismo

O modelo murino de consumo crônico de etanol foi seguido de acordo com modelo padronizado por Yeligar e colaboradores (2012). Esse modelo reproduz os níveis de álcool no sangue após o consumo crônico de etanol em indivíduos humanos (YELIGAR et al., 2012). O álcool etílico (Synth) foi disponibilizado para os animais em uma solução aquosa contendo etanol, durante 12 semanas. Inicialmente, os camundongos passaram por um período de aclimação e adaptação a ingestão forçada de etanol, sendo disponibilizada exclusivamente a solução de etanol a 5% (v/v) na primeira semana, 10% (v/v) na segunda semana e 20% (v/v) nas 10 semanas seguintes.

8.2.3 Avaliação da composição da microbiota intestinal

Antes e durante todo o tratamento com etanol foram coletadas semanalmente amostras de fezes dos camundongos tratados e controles. As amostras foram coletadas em duplicata, sendo que parte dessas amostras foram armazenadas em freezer -20°C para posterior extração de DNA bacteriano e outra parte das amostras foi diluída em solução salina (com volume normalizado pelo peso amostra coletada) e posteriormente cultivada em meios sólidos seletivos MacConkey (Kasvi) e MRS (Interlab) para avaliação do número de unidades formadoras de colônias (UFC) de Enterobactérias e de bactérias ácido lácticas, respectivamente.

O DNA bacteriano total foi extraído das fezes previamente coletadas utilizando Kit para específico (Qiagen - QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit). A extração das amostras foi realizada conforme protocolo recomendado pelo fabricante. A avaliação da composição bacteriana da microbiota, foi realizada por qPCR utilizando-se iniciadores específicos (Tabela 1). Os iniciadores foram desenhados para regiões do gene da subunidade 16S do ribossomo bacteriano, de acordo com o táxon.

Tabela 1: Sequência dos iniciadores de rDNA do gene 16S usados na qPCR para filos bacterianos da microbiota.

Alvo	Sequência (5' – 3')	Referência
Eubacteria	F AA ACTCAA A KGA ATTGACGG R CTCACRR CACGAGCTGAC	(BACCHETTI DE GREGORIS et al., 2011)
Filo Firmicutes	F GGAGYATGTGGTTTAATTCGAAGCA R AGCTGACGACAACCATGCAC	(GUO et al., 2008)
Filo Bacteroidetes	F CRAACAGGATTAGATACCCT R GGTAAGGTTCTCGCGTAT	(BACCHETTI DE GREGORIS et al., 2011)
Filo Actinobacteria	R TACGGCCGCAAGGCTA F TCRTCCCCACCTTCCTCCG	(BACCHETTI DE GREGORIS et al., 2011)
Gammaproteobacteria	R TCGTCAGCTCGTGTGTGTA F CGTAAGGGCCATGATG	(BACCHETTI DE GREGORIS et al., 2011)

8.2.4 Análise estatística

As análises estatísticas e a construção dos gráficos foram realizadas utilizando o software *GraphPad Prism* versão 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, EUA). As

diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram determinadas pela Análise de variância de uma via (One Way-ANOVA), seguida pelo método pós-teste de Tukey. Resultados envolvendo dois grupos experimentais foram analisados pelo teste t Student. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão. Todos os dados foram considerados estatisticamente significantes se $p < 0,05$.

8.3 Resultados

A microbiota intestinal normal está intimamente relacionada à resposta imunológica, inclusive fora do trato gastrointestinal (TGI) (MCALEER et al., 2016). Uma vez que a disbiose tem sido associada com a incidência de várias doenças, foi avaliado se o modelo de consumo de etanol usado nesse trabalho poderia causar alterações na composição da microbiota normal do hospedeiro. Para isso, fezes de camundongos tratados com etanol e animais controle, que beberam apenas água, foram coletadas antes do início do consumo de etanol e semanalmente durante as 12 semanas de tratamento. Essas amostras foram analisadas por meios seletivos, para enterobactérias (MacConkey) e em meio enriquecido para bactérias ácido lácticas (MRS), e quantificação por qPCR.

As análises microbiológicas demonstraram que o consumo de etanol causou um aumento significativo do número de enterobactérias pontualmente nas semanas 4 e 8 de tratamento com etanol. Contudo, a partir da décima semana há um aumento no número de enterobactérias que se mantém até o final do tratamento com álcool, em comparação ao mesmo período no grupo controle (Figura 1A). Já em relação às bactérias ácido lácticas, observou-se diminuição significativa do número dessas bactérias a partir da terceira semana que se mantém até a última semana de tratamento com etanol (Figura 1B).

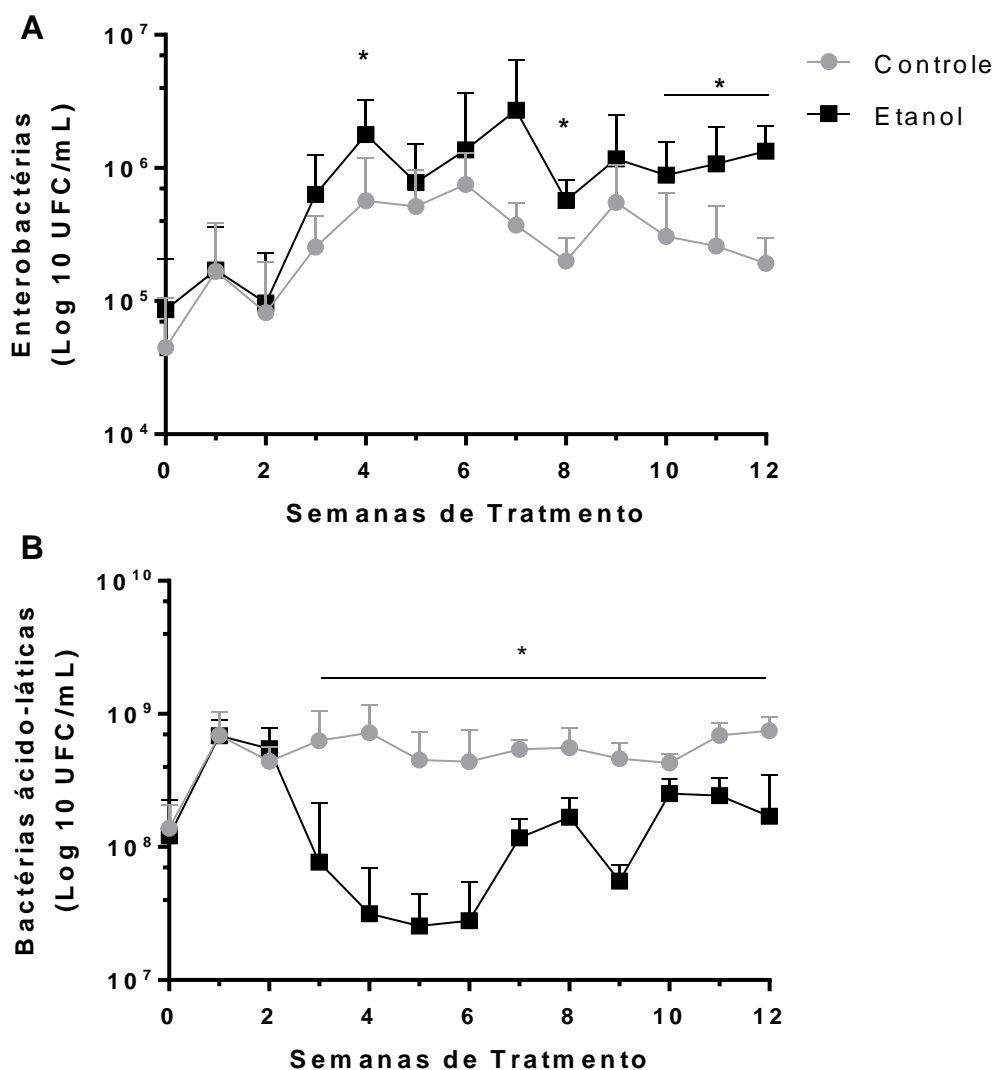


Figura 1. O consumo de etanol altera a composição da microbiota indígena nos camundongos. Fezes dos camundongos tratados ou não com etanol foram cultivadas semanalmente em meios seletivos para enterobactérias (Macconkey) e em meio enriquecido para bactérias ácido láticas (MRS). A contagem das colônias de UFC de (A) enterobactérias e (B) bactérias ácido láticas foram então quantificadas. Os resultados foram expressos como média \pm SD (n=6 camundongos por grupo). *Diferença significativa (p < 0,05).

Para avaliar com mais detalhes o efeito do consumo crônico de etanol na composição da microbiota intestinal, foram obtidos iniciadores para Eubacteria (bactérias totais) e para os 4 principais filos de bactéria da microbiota intestinal, que também são comuns entre roedores e humanos: Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria e Proteobacteria. Os pontos analisados foram 0 (antes do tratamento) e nas semanas 4, 8 e

12 de tratamento.

Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos tratados ou não com etanol para Eubacteria e Firmicutes (Figura 2A e B). Para os filos Bacteroidetes e Actinobacteria, os camundongos que consumiram etanol apresentaram um aumento significativo na semana 8 de tratamento (Figura 2C e D). Já para o filo Proteobacteria, os camundongos que consumiram etanol apresentaram um aumento significativo na semana 12 de tratamento (Figura 2E).

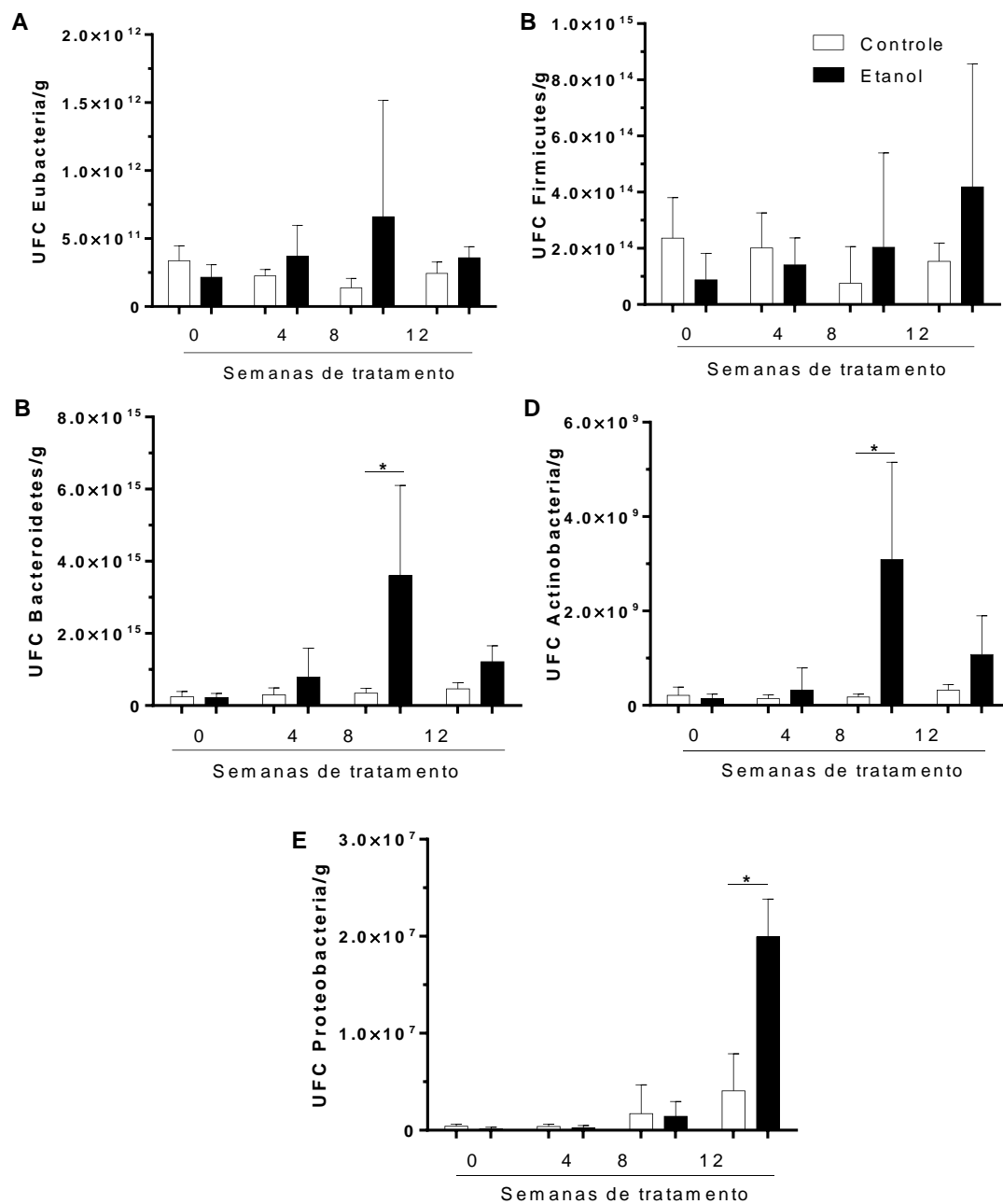


Figura 2. O consumo de etanol altera os filos da microbiota indígena nos camundongos. Fezes dos camundongos tratados ou não com etanol tiveram DNA bacteriano extraído e foram submetidas a qPCR para bactérias totais e para os principais filos de bactérias. A análise se deu pela quantificação total de UFC por grama de fezes. (A) Eubacteria; (B) Firmicutes; (C) Bacteroidetes; (D) Actinobacteria; e (E) Proteobacteria. Os resultados foram expressos como média \pm SD (n=4 camundongos por grupo). *Diferença significativa ($p < 0,05$).

9 DISCUSSÃO

O consumo de etanol está presente na história da civilização desde os seus primórdios (LIEBER, 2005; SZABO; MANDREKAR, 2009). Os relatos sobre a relação entre uma maior susceptibilidade a infecções pulmonares em indivíduos que consumiram etanol datam do século XIII (MOLINA et al., 2010). Nos últimos tempos, evidências clínicas e experimentais têm demonstrado que a exposição ao etanol, seja ela aguda, crônica, moderada ou excessiva pode resultar em alterações no sistema imune de um indivíduo (SZABO; MANDREKAR, 2009).

No presente trabalho, o modelo de infecção por *A. fumigatus* em camundongos imunocompetentes foi estabelecido; os efeitos do consumo crônico de etanol na resposta inflamatória e resolutiva frente ao *A. fumigatus* foram caracterizados e a composição da microbiota intestinal após consumo de etanol também foi avaliada. Além disso, foram avaliados parâmetros de metabolismo celular e migração celular em modelo *in vitro* de exposição de neutrófilos ao etanol. Os principais achados foram:

- A infecção por *A. fumigatus* em camundongos imunocompetentes induziu uma resposta inflamatória robusta, caracterizada principalmente pela grande produção de mediadores inflamatórios e recrutamento de neutrófilos. Essa infecção teve caráter auto limitante, já que apresentou resolução espontânea com níveis de mediadores e células inflamatórias próximos aos níveis basais após 7 dias de infecção.
- O consumo crônico de etanol foi responsável pela elevada carga fúngica pós-infecção e conseqüentemente causou uma maior susceptibilidade do hospedeiro consumista de etanol à infecção. Também foi responsável por desencadear falha na ativação, rolamento, adesão e migração de neutrófilos para o foco inflamatório. Os neutrófilos circulantes de animais que consomem cronicamente etanol apresentam menor expressão do receptor de quimiocinas CXCR2, o que explicou a falha na migração dessa célula. Mais ainda, os neutrófilos dos animais expostos cronicamente ao etanol também apresentaram deficiência na fagocitose, produção de ROS e depuração fúngica.
- O consumo crônico de etanol, de forma geral, causou diminuição do recrutamento de células e desbalanço na liberação de citocinas e quimiocinas importantes para coordenar a resposta inflamatória em fases mais tardias da infecção por *A. fumigatus*, o que causou o aumento no intervalo de tempo de resolução da resposta inflamatória.

- Quando neutrófilos foram expostos *in vitro* a etanol, eles apresentaram: (1) menor quimiotaxia; (2) menor capacidade fagocítica; (3) menor internalização do receptor CXCR2; (4) maior expressão de pERK após estímulo com CXCL1.
- Houve também a perturbação de populações bacterianas intestinais importantes, como o aumento do número de enterobactérias e diminuição da quantidade de bactérias ácido lácticas

O consumo crônico de etanol é descrito como sendo fator determinante para o aumento da susceptibilidade a infecções. Um estudo que avaliou o efeito do consumo de etanol 20% (v/v) na susceptibilidade a infecção por *Klebsiella pneumoniae* mostrou que após 12 semanas há letalidade total dos animais (OHAMA et al., 2014). Outros estudos que também utilizaram modelos de consumo crônico de etanol por 12 semanas demonstraram maior susceptibilidade nos camundongos consumistas em infecções de pele causadas por *Staphylococcus aureus* (PARLET et al., 2015); e aumentou o estresse oxidativo e a mortalidade após indução de sepse não letal (CERON et al., 2018) e infecção de macrófagos alveolares por *K. pneumoniae* (YELIGAR et al., 2012).

O padrão de resposta celular no sítio da infecção é essencial para compreender as interações patógeno-hospedeiro no desfecho de uma pneumonia (MEHRAD; STANDIFORD, 1999). Em relação aos principais tipos celulares que atuam na resposta inflamatória contra *Aspergillus*, é conhecido que a presença de neutrófilos e de macrófagos é essencial para o controle dessa infecção (GAZENDAM et al., 2015; LATGÉ, 2001; ROBERTSON et al., 2008; ZHOU et al., 2014). Além disso, há também a participação de linfócitos e a produção de IL-17 (CURBELO; GALVÁN; ASPA, 2014).

Foi observado que o consumo crônico de etanol causou diminuição no influxo de neutrófilos e linfócitos, sendo que esta redução não é relacionada à diminuição dos níveis de leucócitos circulantes e nem com a liberação de citocinas antes da infecção. A importância da migração dos neutrófilos é bem estabelecida em modelos experimentais de sepse, tanto polimicrobiana quanto induzida por inoculação com *C. albicans* (SÔNEGO et al., 2016; SONG et al., 2012). Camundongos que sofreram depleção de neutrófilos e foram posteriormente infectados com *Candida albicans* tiveram uma maior disseminação do fungo, gerando uma resposta inflamatória sistêmica, seguida pela morte do hospedeiro (SÔNEGO et al., 2016). Além disso, tem sido demonstrado que tanto a depleção de neutrófilos quanto a falha na

produção de ROS são altamente susceptíveis à infecções por *A. fumigatus* (HOGAN; WHEELER, 2014; LATGÉ; CHAMILOS, 2020; LIONAKIS; ILIEV; HOHL, 2017).

Na literatura, é bem estabelecido que a diminuição da expressão ou o antagonismo do receptor de quimiocinas CXCR2 causa falha na migração de neutrófilos para as vias aéreas (CACALANO et al., 1994; RUSSO et al., 2009; TAN et al., 2020), como em casos de sepse grave (LEY et al., 2007; RIOS-SANTOS et al., 2007). Além disso, a resposta à sepse grave é caracterizada por uma cadeia de eventos complexos, que envolvem inflamação sistêmica inapropriada, com grande liberação de vários mediadores pró- e anti-inflamatórios na corrente sanguínea (PIERRAKOS; VINCENT, 2010), como as quimiocinas CXCL8 (em humanos) e CXCL1 (em camundongos) (ALVES-FILHO et al., 2009; PIERRAKOS; VINCENT, 2010).

As quimiocinas CXCL1 e CXCL2 são moléculas positivamente carregadas, que estão imobilizadas no endotélio por ligações a componentes negativamente carregados, que servem de âncoras para evitar que a força de cisalhamento as arraste. Dessa forma, há a formação de um gradiente quimiotático. O sinal dessas quimiocinas via o seu receptor CXCR2 tem um papel crucial, porém não exclusivo, na ativação de neutrófilos e subsequente promoção da adesão ao endotélio no processo de migração celular (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013). Dentre os mecanismos que podem levar ao número insuficiente de neutrófilos no sítio da infecção, tem sido mostrado que o receptor de quimiocinas CXCR2 é internalizado nos neutrófilos circulantes de camundongos e de pacientes com sepse grave (ALVES-FILHO et al., 2009; NASCIMENTO et al., 2017).

Considerando a liberação de mediadores pró-inflamatórios no sangue após infecção nos animais tratados com etanol, foi verificada uma grande quantidade de CXCL1 no soro, indicando que o impedimento na migração de neutrófilos pode ser semelhante aos casos de sepse. Os receptores CXC são membros da família de receptores acoplados à proteína G (GPCR), e GRKs são proteínas quinase que regulam a internalização do receptor de quase todas as famílias de GPCR, incluindo os receptores de quimiocinas CXCRs e CCRs (MÉTAYÉ et al., 2005). Nesse sentido, também foi observado nesse trabalho, que os animais que consumiram etanol tiveram grande redução da expressão do receptor CXCR2 nos neutrófilos circulantes do sangue. Já nos experimentos *in vitro*, foi mostrado que a expressão do receptor CXCR2 é menor, após exposição de neutrófilos ao etanol.

Em relação a outros mecanismos intracelulares associados à migração neutrofilica, tem-se que durante a inflamação ou após um estímulo inflamatório por LPS, a fosforilação de proteínas ERK em neutrófilos é aumentada, o que por consequência também causa a ativação

de proteínas GRK2. Então, há a translocação de GRK2 para a superfície celular e diminuição da expressão de CXCR2 na superfície celular e a migração celular. Ao mesmo tempo, a proteína P38 é fosforilada e ativada, o que inibe a ativação de GRK2, isso então reduz a translocação de GRK2 para a superfície celular, por sua vez promovendo a expressão de CXCR2 na superfície celular e a migração celular (LIU et al., 2012b). Os resultados deste trabalho, sugeriram que os neutrófilos não expostos ao etanol apresentaram aumento discreto na expressão de pP38 e é dependente da concentração do estímulo com CXCL1, enquanto para as células expostas ao etanol houve um aumento na expressão de pP38 apenas na concentração intermediária. Um estudo de Hsu e colaboradores demonstrou que o consumo crônico de etanol diminuiu a expressão de pP38 e aumentou a expressão de pERK 1/2 no fígado de ratos que foram submetidos a hepatectomia parcial (HSU et al., 2006). Outro trabalho, utilizando células de *Kupffer* extraídas de ratos submetidos a dieta com etanol ou macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 expostos ao etanol em cultura, mostrou que a exposição ao etanol potencializou a expressão de pP38 e também a produção de TNF- α após estímulo com LPS (KISHORE; MCMULLEN; NAGY, 2001). Apesar da relação entre a expressão de pP38 e pERK 1/2 serem bem estabelecidas na migração neutrofílica, o efeito da exposição de células ao etanol na expressão dessas proteínas ainda não foi completamente elucidado, sobretudo tratando-se de neutrófilos. Dessa forma, mais experimentos se fazem necessários para se entender se o mecanismo pelo qual o etanol afeta a migração neutrofílica é causado pelo efeito na expressão de pP38 e pERK 1/2 nessas células.

Neste estudo também foi demonstrado que a produção da citocina IL-17 pelas células T CD4+, após a infecção pelo fungo *A. fumigatus*, é prejudicada em camundongos que consumiram etanol, enquanto os animais controle aumentaram significativamente os níveis dessa citocina após um dia de infecção. As células produtoras de IL-17 são consideradas essenciais para a defesa antifúngica, e fungos são particularmente potentes indutores de resposta Th17 (KOYASU; MORO, 2012). Em modelo de consumo crônico de etanol seguido de infecção cutânea por *Staphylococcus aureus*, os autores demonstraram que os camundongos tratados com etanol apresentaram maiores quantidades de lesões cutâneas, maior perda de peso e bacteremia elevada em comparação com os animais controle. O mecanismo subjacente à falha na migração de neutrófilos para o local da lesão e, conseqüentemente, o controle da infecção, se relaciona à redução da produção de IL-1 β e IL-17, sugerindo que a resposta neutrofílica mediada por linfócitos Th17 está prejudicada nos camundongos que consumiram etanol (PARLET et al., 2015).

Outras citocinas que também foram encontradas com níveis alterados neste estudo em animais consumistas de etanol foram as citocinas TNF- α e IL-10. O TNF- α é também um dos principais mediadores da resposta inflamatória aguda e é produzido por fagócitos mononucleares ativados, células NK e mastócitos em resposta a antígenos microbianos, e estimulam neutrófilos e monócitos a migrarem para o sítio de infecção (ROACH et al., 2002). A sinalização pelo receptor de TNF (TNFR1) é essencial no controle da infecção por *Legionella pneumophila*. Os macrófagos alveolares dependem do TNF derivado de neutrófilos e monócitos para a sinalização através de TNFR1 para restringir a replicação bacteriana, e esse mecanismo é dependente da fagocitose de *L. pneumophila* (ZILTENER; REINHECKEL; OXENIUS, 2016).

Já a IL-10 é bem conhecida como sendo uma citocina reguladora e anti-inflamatória, sendo parte do grande programa de resolução da resposta inflamatória, já que suas principais funções incluem o bloqueio do recrutamento de células adicionais para o sítio de infecção e colaboram para a apoptose de leucócitos inflamatórios (BASIL; LEVY, 2016). A citocina IL-10 tem sido descrita com uma das mais importantes na supressão de produção de citocinas pró-inflamatórias induzidas por TLR4. Sua atividade supressora ocorre não somente pela inibição direta de transcrição gênica, mas também pela desestabilização de mRNA ou pelo bloqueio do processo de tradução (SABAT et al., 2010).

O consumo de etanol foi demonstrado como um fator que altera a concentração de mediadores resolutivos lipídicos no plasma de pacientes com diabetes do tipo 2 (BARDEN et al., 2018) e também como responsável por regular positivamente *in vitro* a expressão de genes relacionados a receptores de glicocorticoides e de GILZ (NG et al., 2017). Além disso, sabe-se que para uma resolução eficiente da resposta inflamatória, a inativação do neutrófilo, bem como sua apoptose e remoção do tecido devem acontecer de maneira coordenada. Em conjunto com a apoptose de neutrófilos, também acontece o recrutamento e diferenciação de macrófagos que apresentam fenótipo característico anti-inflamatório, já que a produção de mediadores por essas células tem como objetivo a remissão dos sinais inflamatórios (BASIL; LEVY, 2016). O índice de resolução caracteriza a resolução da resposta inflamatória e ajuda a determinar a persistência das subpopulações de leucócitos (PRÜSS et al., 2011). No presente estudo, foi observado um atraso no índice de resolução dos animais tratados com etanol em comparação aos animais não tratados. Tomados em conjunto a liberação de mediadores e o recrutamento celular após infecção por *A. fumigatus*, os resultados deste trabalho sugerem que o modelo de consumo

crônico de etanol causou uma perda de controle do inflamatório que parece afetar também a resolução da resposta inflamatória.

Além da regulação de mediadores inflamatórios, a reprogramação do metabolismo celular pode também influenciar no desencadeamento de uma resposta inflamatória e causar maior dano (AL-KHAMI; RODRIGUEZ; OCHOA, 2017b; TAN et al., 2020). Os neutrófilos são células que contam quase que exclusivamente com a glicólise para suportar a geração de ATP e para o *clearance* microbiano (AL-KHAMI; RODRIGUEZ; OCHOA, 2017b). Tan e colaboradores (2020) demonstraram em modelo de sepse que a inibição da glicólise aeróbia promove um maior influxo de neutrófilos para o sítio infeccioso via sinalização de CXCR2. O uso do inibidor da via glicolítica 2-deoxiglicose (2DG) promoveu também a maior sobrevivência dos camundongos na sepse (TAN et al., 2020). Neste trabalho não foram observadas alterações significativas na captação de glicose pelos neutrófilos expostos a etanol *in vitro*. Contudo, considerando a área crescente do imunometabolismo e sua importância no fenótipo de diversas doenças inflamatórias, a análise de mais experimentos para entender detalhadamente a plasticidade das vias de metabolismo energético nessas células após exposição a etanol e seus efeitos são um campo de estudo promissor.

Assim como a regulação do balanço de citocinas e a reprogramação do metabolismo celular, a dieta tem um papel crucial na composição da microbiota intestinal e consequentemente na saúde do hospedeiro. A disbiose se refere a composição alterada da microbiota intestinal associada também com mudanças funcionais no transcriptoma, proteoma ou metaboloma (ZENG; INOHARA; NUÑEZ, 2017). A disbiose é originada partir de mudanças na abundância relativa de populações de bactérias, causadas por mudanças na dieta, inflamação, deficiências no sistema imune, infecção ou exposição a antibióticos ou toxinas (TROHA; AYRES, 2020). Essas perturbações na microbiota podem favorecer a o crescimento de enterobactérias, já que em contextos de mudanças nutricionais e ambientais que causam disbiose essas bactérias são frequentemente observadas (ZENG; INOHARA; NUÑEZ, 2017).

Um estudo feito em camundongos transplantados com microbiota humana (modelo humanizado), mostrou que camundongos que consumiram uma dieta com altas quantidades de açúcar e gordura exibiram redução da quantidade de bactérias do filo Bacteroidetes e um maior crescimento do filo Firmicutes (TURNBAUGH et al., 2009). Além disso, diversos trabalhos têm demonstrado que o consumo de etanol afeta a composição da microbiota intestinal e induz o crescimento exacerbado de bactérias gram-negativas (DE TIMARY et al., 2015; ENGEN et al., 2015; MCC et al., 2014).

Os resultados apresentados nesse estudo, mostram que o tratamento com etanol aumentou significativamente a quantidade de enterobactérias nas últimas semanas de tratamento e reduziu drasticamente a população de bactérias ácido lácticas intestinais. As enterobactérias são bactérias gram-negativas pertencentes ao filo Proteobactéria e que residem em níveis baixos no intestino de humanos e murinos. Nesse grupo de bactérias também são encontrados vários grupos de patógenos oportunistas, como por exemplo *E. coli*. (ZENG; INOHARA; NUÑEZ, 2017). Já as bactérias ácido lácticas constituem um grupo diverso de bactérias gram-positivas fermentadoras, cujo produto da fermentação é o ácido láctico (CARR; CHILL; MAIDA, 2002). Além disso, essas bactérias são capazes de suprimir o crescimento de outros microrganismos, já que existem evidências de que estas bactérias produzem uma variedade de substâncias antifúngicas (SCHNÜRER; MAGNUSSON, 2005).

Canesso e colaboradores (2014) estudaram o papel da microbiota na lesão hepática induzida por consumo de etanol agudo. Trataram camundongos convencionais e isentos de germes com etanol e avaliaram a disbiose e o dano hepático causados pela dieta. Foi observado que os animais convencionais tratados com etanol foram os únicos que apresentaram lesão hepática e, associado a isso, eles também apresentaram um crescimento do número de enterobactérias e diminuição na quantidade de bactérias ácido lácticas em comparação aos animais isentos de germes, também tratados com álcool, indicando que o impacto do consumo de álcool na microbiota pode acentuar a lesão hepática induzida por álcool (CANESSO et al., 2014). Outro estudo em modelo de doença alcoólica hepática em camundongos demonstrou que o consumo de 5% (v/v) de etanol por 6 semanas diminuiu a abundância dos filos Bacteroidetes e Firmicutes e causou um aumento no número de bactérias gram-negativas do filo Proteobactéria e gram-negativa do filo Actinobacteria. Concomitante às alterações na microbiota, também foi observado nesses animais um aumento de LPS no plasma, maior inflamação e lesão hepática. (BULL-OTTERSON et al., 2013).

Um estudo de Wood e colaboradores (2013) mostrou que *in vitro* o tratamento diário de células do epitélio intestinal com 0,2% de etanol por 2 meses, impactou as junções do tipo *tigh* da barreira intestinal, fazendo com que essas células se tornassem mais vulneráveis ao dano induzido por vários tipos de bactérias, incluindo *Pseudomonas aeruginosa* e *Shigella sonnei* (WOOD et al., 2013). Outro estudo demonstrou que camundongos que tiveram a microbiota depletada por coquetel de antibióticos e consequente reconstituição por transplante fecal de camundongos tratados com etanol por 10 dias foram susceptíveis a infecção com *K. pneumoniae*. Essa maior susceptibilidade foi também associada a maior carga bacteriana, maior

liberação de citocinas pró-inflamatórias, diminuição de linfócitos T CD4 e CD8 e consequente sequestro dessas células para o intestino desses animais (SAMUELSON et al., 2017). Sendo assim, os resultados demonstram que o consumo crônico de etanol é um fator crucial para a perturbação e consequente disbiose de importantes populações microbianas intestinais e que estão intimamente relacionadas a resposta imune pulmonar.

10 CONCLUSÃO

Os resultados gerados neste trabalho demonstram que a infecção pulmonar por *Aspergillus fumigatus* gera um processo inflamatório intenso, agudo e auto limitante com intensa participação neutrofílica. Durante o consumo crônico de etanol este fenótipo é alterado, pois há: (i) maior susceptibilidade à infecção; (ii) diminuição da ativação e da migração neutrofílica para o foco infeccioso; (iii) diminuição do número de linfócitos produtores de IL-17; (iv) diminuição da fagocitose, *killing* e produção de ROS pelos neutrófilos; (v) desbalanço na liberação de mediadores e células no sítio infeccioso nas fases tardias da infecção e aumento do tempo de resolução. Além disto, foi verificado que parte deste fenótipo gerado pelo consumo crônico de etanol pode acontecer por alterações em mecanismos de sinalização e pela mudança da composição da microbiota indígena.

Desta forma, tomados em conjunto, os resultados nos permitem concluir que o consumo crônico de etanol altera a resposta inflamatória pulmonar através de alterações importantes em mecanismos-chave para o combate a infecções como a alteração de funções efetoras importantes de células do sistema imunológico como os neutrófilos e linfócitos e modificação da microbiota intestinal, causando maior susceptibilidade à infecção por *Aspergillus fumigatus*.

Experimentos futuros são necessários para entender melhor os mecanismos moleculares pelos quais a exposição crônica de etanol piora a resposta inflamatória frente a infecções pulmonares, como as infecções por *A. fumigatus*.

11 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHERN, P. P.; MALOY, K. J. Understanding immune–microbiota interactions in the intestine. **Immunology**, v. 159, n. 1, p. 4–14, 2020.

AL-KHAMI, A. A.; RODRIGUEZ, P. C.; OCHOA, A. C. Energy metabolic pathways control the fate and function of myeloid immune cells. v. 102, n. August, 2017a.

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, 2017b.

ALVES-FILHO, J. C. et al. Regulation of chemokine receptor by Toll-like receptor 2 is critical to neutrophil migration and resistance to polymicrobial sepsis. 2009.

BACCHETTI DE GREGORIS, T. et al. Improvement of phylum- and class-specific primers for real-time PCR quantification of bacterial taxa. **Journal of Microbiological Methods**, v. 86, n. 3, p. 351–356, 2011.

BALA, S. et al. Acute binge drinking increases serum endotoxin and bacterial DNA levels in healthy individuals. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, p. 8–12, 2014.

BARDEN, A. et al. The effects of alcohol on plasma lipid mediators of inflammation resolution in patients with type 2 diabetes mellitus. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, 2018.

BASIL, M. C.; LEVY, B. D. Specialized pro-resolving mediators: Endogenous regulators of infection and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 1, p. 51–67, 2016.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.

BRIELAND, J. K. et al. Cytokine networking in lungs of immunocompetent mice in response to inhaled *Aspergillus fumigatus*. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 3, p. 1554–1560, 2001.

BUCK, M. D. et al. Metabolic Instruction of Immunity. **Cell**, v. 169, n. 4, p. 570–586, 2017.

- BULL-OTTERSON, L. et al. Metagenomic Analyses of Alcohol Induced Pathogenic Alterations in the Intestinal Microbiome and the Effect of Lactobacillus rhamnosus GG Treatment. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, p. 4–13, 2013.
- CACALANO, G. et al. Neutrophil and B cell expansion in mice that lack the murine IL-8 receptor homolog. **Science (New York, N.Y.)**, v. 265, n. 5172, p. 682–4, 1994.
- CANESSO, M. et al. Comparing the effects of acute alcohol consumption in germ-free and conventional mice : the role of the gut microbiota. p. 1–10, 2014.
- CARR, F. J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The lactic acid bacteria: A literature survey. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 28, n. 4, p. 281–370, 2002.
- CERON, C. S. et al. Chronic ethanol consumption increases vascular oxidative stress and the mortality induced by sub-lethal sepsis: Potential role of iNOS. **European Journal of Pharmacology**, v. 825, p. 39–47, 2018.
- CHOVATIYA, R.; MEDZHITOV, R. Stress, inflammation, and defense of homeostasis. **Molecular Cell**, v. 54, n. 2, p. 281–288, 2014.
- CLAESSON-WELSH, L. Vascular permeability - The essentials. **Upsala Journal of Medical Sciences**, v. 120, n. 3, p. 135–143, 2015.
- CURBELO, J.; GALVÁN, J. M.; ASPA, J. Updates on Aspergillus, Pneumocystis and other opportunistic pulmonary mycoses. **Archivos de Bronconeumologia**, n. xx, 2014.
- DE TIMARY, P. et al. A dysbiotic subpopulation of alcohol-dependent subjects. **Gut Microbes**, v. 6, n. 6, p. 388–391, 2015.
- ENAUD, R. et al. The Gut-Lung Axis in Health and Respiratory Diseases: A Place for Inter-Organ and Inter-Kingdom Crosstalks. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, n. February, p. 1–11, 2020.
- ENGEN, P. A. et al. The Gastrointestinal Microbiome: Alcohol Effects on the Composition of Intestinal Microbiota. **Alcohol research : current reviews**, v. 37, n. 2, p. 223–36, 2015.
- GAZENDAM, R. P. et al. Human Neutrophils Use Different Mechanisms To Kill Aspergillus fumigatus Conidia and Hyphae: Evidence from Phagocyte Defects. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, p. 1501811, 2015.

- GONÇALVES, S. M. et al. The microbiome-metabolome crosstalk in the pathogenesis of respiratory fungal diseases. **Virulence**, v. 8, n. 6, p. 1–12, 2016.
- GUO, X. et al. Development of a real-time PCR method for Firmicutes and Bacteroidetes in faeces and its application to quantify intestinal population of obese and lean pigs. **Letters in Applied Microbiology**, v. 47, n. 5, p. 367–373, 2008.
- GUTHRIE, L. A. et al. Priming of neutrophils for enhanced release of oxygen metabolites by bacterial lipopolysaccharide: Evidence for increased activity of the superoxide-producing enzyme. **Journal of Experimental Medicine**, v. 160, n. 6, p. 1656–1671, 1984.
- HEADLAND, S. E.; NORLING, L. V. The resolution of inflammation: Principles and challenges. **Seminars in Immunology**, v. 27, n. 3, p. 149–160, 2015.
- HEROLD, S.; MAYER, K.; LOHMEYER, J. Acute lung injury: How macrophages orchestrate resolution of inflammation and tissue repair. **Frontiers in Immunology**, v. 2, n. NOV, p. 1–13, 2011.
- HOGAN, D.; WHEELER, R. T. The complex roles of NADPH oxidases in fungal infection. **Cellular Microbiology**, v. 16, n. 8, p. 1156–1167, 2014.
- HOOPER, L. V; LITTMAN, D. R.; MACPHERSON, A. J. Interactions Between the Microbiota and the Immune System The Gut Microbiota Interactions Between the Microbiota and the Immune System. **Science (New York, N.Y.)**, v. 336, n. 6086, p. 1268–1273, 2012.
- HSU, M. K. H. et al. Ethanol reduces p38 kinase activation and cyclin D1 protein expression after partial hepatectomy in rats. **Journal of Hepatology**, v. 44, n. 2, p. 375–382, 2006.
- HUANG, J. et al. Methods for measuring myeloperoxidase activity toward assessing inhibitor efficacy in living systems. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 99, n. 4, p. 541–548, 2016.
- KAMADA, N. et al. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 5, p. 321–335, 2013.
- KELLY, B.; O’NEILL, L. A. J. Metabolic reprogramming in macrophages and dendritic cells in innate immunity. **Cell Research**, v. 25, n. 7, p. 771–784, 2015.
- KISHORE, R.; MCMULLEN, M. R.; NAGY, L. E. Stabilization of Tumor Necrosis Factor α mRNA by Chronic Ethanol.pdf. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 45, p. 41930–

41937, 2001.

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

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

LATGÉ, J.-P.; CHAMILOS, G. Aspergillus fumigatus and Aspergillosis in 2019. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 33, n. 1, p. 1–75, 2020.

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

LECLERCQ, S. et al. The link between inflammation, bugs, the intestine and the brain in alcohol dependence. **Translational Psychiatry**, v. 7, n. 2, 2017.

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

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

LIONAKIS, M. S.; ILIEV, I. D.; HOHL, T. M. Immunity against fungi. **JCI insight**, v. 2, n. 11, p. 1–17, 2017.

LIU, T. F. et al. Fueling the flame: bioenergy couples metabolism and inflammation. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 92, p. 499–507, 2012a.

LIU, X. et al. Bidirectional regulation of neutrophil migration by mitogen-activated protein kinases. **Nature Immunology**, v. 13, n. 5, p. 457–464, 2012b.

LOPES, F. et al. ER-stress mobilization of death-associated protein kinase-1- dependent xenophagy counteracts mitochondria stress-induced epithelial barrier dysfunction. **Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 9, p. 3073–3087, 2018.

MAKOWSKI, L.; CHAIB, M.; RATHMELL, J. C. Immunometabolism: From basic mechanisms to translation. **Immunological Reviews**, v. 295, n. 1, p. 5–14, 2020.

MALACCO, N. L. S. O. et al. Acute lung injury and repair induced by single exposure of Aspergillus fumigatus in immunocompetent mice. **Future Microbiology**, v. 14, n. 17, p. 1511–

1525, 2020.

MARGRAF, A.; LEY, K.; ZARBOCK, A. Neutrophil Recruitment: From Model Systems to Tissue-Specific Patterns. **Trends in Immunology**, v. 40, n. 7, p. 613–634, 2019.

MCC, C. et al. Comparing the effects of acute alcohol consumption in germ-free and conventional mice: the role of the gut microbiota. **BMC Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 240, 2014.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 428–435, 2008.

MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 771–776, 2010.

MEHRAD, B.; STANDIFORD, T. J. Use of Animal Models in the Study of Inflammatory Mediators of Pneumonia. **ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources**, v. 40, n. 4, p. 167–174, 1999.

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

MOLINA, P. E. et al. Focus on: Alcohol and the immune system. **Alcohol research & health : the journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism**, v. 33, n. 1–2, p. 97–108, 2010.

MOREL, L. Immunometabolism in systemic lupus erythematosus. **Rheumatology**, p. 1–11, 2017.

NASCIMENTO, D. C. et al. IL-33 contributes to sepsis-induced long-Term immunosuppression by expanding the regulatory T cell population. **Nature Communications**, v. 8, 2017.

NG, H. P. et al. Non-canonical glucocorticoid receptor transactivation of gilz by alcohol suppresses cell inflammatory response. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. JUN, p. 8–11, 2017.

NG, L. G.; OSTUNI, R.; HIDALGO, A. Heterogeneity of neutrophils. **Nature Reviews Immunology**, v. 19, n. April, p. 255–265, 2019.

NORLING, L. V.; SERHAN, C. N. Profiling in resolving inflammatory exudates identifies novel anti-inflammatory and pro-resolving mediators and signals for termination. **Journal of**

Internal Medicine, v. 268, n. 1, p. 15–24, 2010.

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

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

PETRI, B.; SANZ, M. J. Neutrophil chemotaxis. **Cell and Tissue Research**, v. 371, n. 3, p. 425–436, 2018.

PIERRAKOS, C.; VINCENT, J.-L. Sepsis biomarkers: a review. **Critical care (London, England)**, v. 14, n. R15, 2010.

PRÜSS, H. et al. Non-resolving aspects of acute inflammation after spinal cord injury (SCI): Indices and resolution plateau. **Brain Pathology**, v. 21, n. 6, p. 652–660, 2011.

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

RIOS-SANTOS, F. et al. Down-regulation of CXCR2 on neutrophils in severe sepsis is mediated by inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 175, n. 5, p. 490–497, 2007.

ROBERTSON, C. M. et al. Neutrophil Depletion Causes a Fatal Defect in Murine Pulmonary *Staphylococcus aureus* clearance. **Journal of Surgical Research**, v. 150, n. 2, p. 278–285, 2008.

RUSSELL, D. G.; HUANG, L.; VANDERVEN, B. C. Immunometabolism at the interface between macrophages and pathogens. **Nature Reviews Immunology**, v. 19, n. 5, p. 291–304, 2019.

RUSSO, R. C. et al. Role of the chemokine receptor CXCR2 in bleomycin-induced pulmonary inflammation and fibrosis. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 40, n. 4, p. 410–421, 2009.

- SABAT, R. et al. Biology of interleukin-10. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 21, n. 5, p. 331–44, 1 out. 2010.
- SAMUELSON, D. R. et al. Alcohol-associated intestinal dysbiosis impairs pulmonary host defense against *Klebsiella pneumoniae*. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 6, p. 1–25, 2017.
- SCHNÜRER, J.; MAGNUSSON, J. Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. **Trends in Food Science and Technology**, v. 16, n. 1–3, p. 70–78, 2005.
- SHEN, Y.-A. et al. Metabolic reprogramming orchestrates cancer stem cell properties in nasopharyngeal carcinoma. **Cell Cycle**, v. 14, n. 1, p. 86–98, 2015.
- SOEHNLEIN, O.; LINDBOM, L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 6, p. 427–439, 2010.
- SÔNEGO, F. et al. Paradoxical Roles of the Neutrophil in Sepsis: Protective and Deleterious. **Frontiers in Immunology**, v. 7, n. April, p. 1–7, 2016.
- SONG, S. O. K. et al. Ensemble models of neutrophil trafficking in severe sepsis. **PLoS Computational Biology**, v. 8, n. 3, 2012.
- SORIANI, F. M. et al. Functional characterization of the *Aspergillus fumigatus* CRZ1 homologue, CrzA. **Molecular Microbiology**, v. 67, n. 6, p. 1274–1291, 2008.
- STADTMANN, A.; ZARBOCK, A. CXCR2: From bench to bedside. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. AUG, p. 1–12, 2012.
- SUGIMOTO, M. A. et al. Mediators of the Resolution of the Inflammatory Response. **Trends in Immunology**, v. 40, n. 3, p. 212–227, 2019.
- SZABO, G.; MANDREKAR, P. A Recent Perspective on Alcohol , Immunity , and Host Defense. v. 33, n. 2, p. 220–232, 2009.
- TAN, C. et al. Inhibition of Aerobic Glycolysis Promotes Neutrophil to Influx to the Infectious Site Via CXCR2 in Sepsis. **Shock**, v. 53, n. 1, p. 114–123, 2020.
- THAKUR, R. et al. Cytokines induce effector T-helper cells during invasive aspergillosis; what we have learned about T-helper cells? **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. MAY, p. 1–6, 2015.
- TROHA, K.; AYRES, J. S. Metabolic Adaptations to Infections at the Organismal Level.

Trends in Immunology, v. 41, n. 2, p. 113–125, 2020.

TURNBAUGH, P. J. et al. The effect of diet on the human gut microbiome: A metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. **Science Translational Medicine**, v. 1, n. 6, 2009.

VAGO, J. P. et al. Proresolving Actions of Synthetic and Natural Protease Inhibitors Are Mediated by Annexin A1. **The Journal of Immunology**, 2016.

VAN DEN BOSSCHE, J. et al. Mitochondrial Dysfunction Prevents Repolarization of Inflammatory Macrophages. **Cell Reports**, v. 17, n. 3, p. 684–696, 2016.

VARELA, M. L. et al. Acute Inflammation and Metabolism. **Inflammation**, v. 41, n. 4, p. 1115–1127, 2018.

WOOD, S. et al. Chronic Alcohol Exposure Renders Epithelial Cells Vulnerable to Bacterial Infection. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, 2013.

YELIGAR, S. M. et al. Ethanol induces oxidative stress in alveolar macrophages via upregulation of NADPH oxidases. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 188, n. 8, p. 3648–57, 2012.

YU, A. I. et al. Gut Microbiota Modulate CD8 T Cell Responses to Influence Colitis-Associated Tumorigenesis. **Cell Reports**, v. 31, n. 1, p. 107471, 2020.

ZEMANS, R. L.; COLGAN, S. P.; DOWNEY, G. P. Transepithelial migration of neutrophils: Mechanisms and implications for acute lung injury. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 40, n. 5, p. 519–535, 2009.

ZENG, M. Y.; INOHARA, N.; NUÑEZ, G. Mechanisms of inflammation-driven bacterial dysbiosis in the gut. **Mucosal Immunology**, v. 10, n. 1, p. 18–26, 2017.

ZHANG, D. et al. The Cross-Talk Between Gut Microbiota and Lungs in Common Lung Diseases. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. February, p. 1–14, 2020.

ZHOU, D. et al. Macrophage polarization and function with emphasis on the evolving roles of coordinated regulation of cellular signaling pathways. **Cellular Signalling**, v. 26, n. 2, p. 192–197, 2014.

ZHU, J.; YAMANE, H.; PAUL, W. Differentiation of effector CD4 T cell populations. **Annu Rev Immunol.**, v. 28, n. 1, p. 445–489, 2010.

ZILTENER, P.; REINHECKEL, T.; OXENIUS, A. Neutrophil and Alveolar Macrophage-Mediated Innate Immune Control of Legionella pneumophila Lung Infection via TNF and ROS. **PLOS Pathogens**, v. 12, n. 4, p. e1005591, 2016.

12 PRODUÇÃO CIENTÍFICA

1. **Malacco, Nathalia Luisa Sousa de Oliveira;** Souza, Jessica Amanda Marques; Martins, Flavia Rayssa Braga; Rachid, Milene Alvarenga; Simplicio, Janaina Aparecida; Tirapelli, Carlos Renato; Sabino, Adriano de Paula; Queiroz-Junior, Celso Martins; Goes, Grazielle Ribeiro; Vieira, Leda Quercia; Souza, Danielle Glória; Pinho, Vanessa; Teixeira, Mauro Martins; Soriani, Frederico Marianetti. Chronic ethanol consumption compromises neutrophil function in acute pulmonary *Aspergillus fumigatus* infection. *Elife*. v.9, p.x - x, 2020.
2. **Malacco, Nathália LSO;** Souza, Jéssica AM; Mendes, Aline C; Rachid, Milene A; Kraemer, Lucas R; Mattos, Matheus S; Lima, Grazielle N; Sousa, Lirlândia P; Souza, Daniele G; Pinho, Vanessa; Teixeira, Mauro M; Russo, Remo C; Soriani, Frederico M. Acute lung injury and repair induced by single exposure of *Aspergillus fumigatus* in immunocompetent mice. *Future Microbiology*. v.14, p.1511 - 1525, 2019.
3. **Malacco, Nathália Luísa Sousa de Oliveira;** Rachid, Milene Alvarenga; Gurgel, Isabella Luisa da Silva; Moura, Tauany Rodrigues; Sucupira, Pedro Henrique Ferreira; Sousa, Lirlândia Pires de; Souza, Daniele da Glória de; Russo, Remo de Castro; Teixeira, Mauro Martins; Soriani, Frederico Marianetti. Eosinophil-Associated Innate IL-17 Response Promotes *Aspergillus fumigatus* Lung Pathology. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. v.8, p.1 - 13, 2019.
4. Gurgel, Isabella Luísa da Silva; Jorge, Karina Talita de Oliveira Santana; **Malacco, Nathália Luísa Sousa de Oliveira;** Souza, Jéssica Amanda Marques; Rocha, Marina Campos; Fernandes, Marina Faria; Martins, Flávia Rayssa Braga; Malavazi, Iran; Teixeira, Mauro Martins; Soriani, Frederico Marianetti. The *Aspergillus fumigatus* Mucin MsbA Regulates the Cell Wall Integrity Pathway and Controls Recognition of the Fungus by the Immune System. *mSphere*. v.4, p.00350, 2019.

13 ANEXOS

13.1 ANEXO 1 – Certificado do Comitê de Ética Experimental

 UFMG	UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS CEUA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
CERTIFICADO Certificamos que o Protocolo nº. 4 / 2015, relativo ao projeto intitulado "Efeito do consumo crônico de álcool nas respostas imune e inflamatória em modelo de aspergilose pulmonar", que tem como responsável Frederico Marianetti Soriani, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 26/05/2015. Este certificado espira-se em 26/05/2020.	
CERTIFICATE We hereby certify that the Protocol nº. 4 / 2015, related to the Project entitled "Effect of chronic alcohol consumption in immune and inflammatory responses in a model of pulmonary aspergillosis.", under the supervision of Frederico Marianetti Soriani, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 26/05/2015. This certificate expires in 26/05/2020.	
Cleuza Maria de Faria Rezende Coordenador(a) da CEUA/UFMG Belo Horizonte, 26/05/2015.	
Atenciosamente.	
Sistema CEUA-UFMG https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/	
Universidade Federal de Minas Gerais Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592 www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br	