

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

Instituto De Ciências Biológicas  
Departamento De Genética, Ecologia E Evolução  
Programa De Pós-Graduação Em Genética

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**CARACTERIZAÇÃO DOS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO ETANOL NA  
RESPOSTA INFLAMATÓRIA GERADA POR *Aspergillus fumigatus***

BELO HORIZONTE

2022

Flávia Rayssa Braga Martins

**CARACTERIZAÇÃO DOS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO ETANOL NA  
RESPOSTA INFLAMATÓRIA GERADA POR *Aspergillus fumigatus***

Dissertação 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 Mestre em Genética.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Frederico Marianetti Soriani

Co-orientadora: Dra. Nathália Luísa Sousa de Oliveira

BELO HORIZONTE

2022

043

Martins, Flávia Rayssa Braga.

Caracterização dos efeitos da exposição ao etanol na resposta inflamatória gerada por *Aspergillus fumigatus* [manuscrito] / Flávia Rayssa Braga Martins. – 2023.

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

Orientador: Prof. Dr. Frederico Marianetti Soriani. Coorientadora: Dra. Nathália Luísa Sousa de Oliveira.

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

1. Genética. 2. Inflamação. 3. Aspergilose. 4. Infecção. 5. Etanol. I. Soriani, Frederico Marianetti . II. Oliveira, Nathália Luísa Sousa de . III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 575



UNIVERSIDADE  
FEDERAL DE MINAS  
GERAIS  
Programa de Pós-  
Graduação em  
Genética Instituto de  
Ciências Biológicas  
**ATA DE DEFESA  
DE  
DISSERTAÇÃO**

<b>ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO</b>	<b>327/2022</b>
	<b>entrada</b>
<b>Flavia Rayssa Braga Martins</b>	<b>1º/2020</b>
	<b>CDE-002 105 326-12</b>

Às quatorze horas do dia **22 de setembro de 2022**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora de Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: "**CARACTERIZAÇÃO DOS EFEITOS PERSISTENTES DO CONSUMO CRÔNICO DE ETANOL NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA**", requisito para obtenção do grau de Mestre 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:

<b>Prof./Pesq.</b>	<b>Instituição</b>	<b>CPF</b>	<b>Indicação</b>
Frederico Marianetti Soriani	UFMG	249.486.428-35	APROVADA
Nathalia Luisa Sousa de Oliveira Malacco	McGill University	094.568.236-01	APROVADA
Caio Tavares Fagundes	UFMG-MIC	067.299.796-74	APROVADA
Adriana Abalen Martins Dias	UFMG	544.099.346-00	APROVADA

Pelas indicações, a candidata foi considerada: **APROVADA**

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

**Belo Horizonte, 22 de setembro de 2022.**

Frederico Marianetti Soriani - Orientador

Nathalia Luisa Sousa de Oliveira

Malacco - Coorientadora Caio Tavares

Fagundes

Adriana Abalen Martins Dias



Documento assinado eletronicamente por **Frederico Marianetti Soriani, Professor do Magistério Superior**, em 23/09/2022, às 10:40, 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 **Adriana Abalen Martins Dias, Professora do Magistério Superior**, em 23/09/2022, às 16:20, 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 **Caio Tavares Fagundes, Professor do Magistério Superior**, em 23/09/2022, às 21:56, 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 **Nathalia Luisa Sousa de Oliveira Malacco, Usuária Externa**, em 26/09/2022, às 09:58, 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](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1671607** e o código CRC **A978BFC5**.



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

## FOLHA DE APROVAÇÃO

### "CARACTERIZAÇÃO DOS EFEITOS PERSISTENTES DO CONSUMO CRÔNICO DE ETANOL NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA "

**Flávia Rayssa Braga Martins**

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Frederico Marianetti Soriani  
UFMG

Nathalia Luisa Sousa de Oliveira Malacco  
McGill University

Caio Tavares  
Fagundes UFMG-MIC

Adriana Abalen Martins Dias  
UFMG

Belo Horizonte, 22 de setembro de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Frederico Marianetti Soriani, Professor do Magistério Superior**, em 23/09/2022, às 10:40, 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 **Adriana Abalen Martins Dias, Professora do Magistério Superior**, em 23/09/2022, às 16:21, 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 **Caio Tavares Fagundes, Professor do Magistério Superior**, em 23/09/2022, às 21:56, 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 **Nathalia Luisa Sousa de Oliveira Malacco, Usuária Externa**, em 26/09/2022, às 09:56, 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](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1671646** e o código CRC **B3581ED6**.

---



## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Minas Gerais, que é referência em toda América Latina e forneceu estrutura para a realização deste projeto.

Ao instituto de Ciências Biológicas da UFMG, que me deu a oportunidade de conhecer pessoas incríveis, de aprender muito com os melhores e, acima de tudo, me deu a profissão, que eu não sabia, mas que sempre sonhei ter.

Aos funcionários, professores e colegas do Programa de Pós Graduação em Genética da UFMG.

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

Aos colaboradores deste trabalho: Nathália, Débora, Vinicius, Celso, Isabelle, Professora Vanessa, Professora Bárbara e Professor Frederico.

Ao Laboratório ImunoFarmacologia, por ser um grupo tão plural e disponível, onde eu sempre me senti acolhida para perguntar e aprender. Em especial o Professor Mauro Teixeira, a Ilma e a Rose, que dão condições para a existência deste grupo.

Ao Laboratório de Genética Funcional, Isabella, Isabelle, Giovana, Ana Carol, Marina e Thais, pela parceria nos dias de glória e de luta durante todo o mestrado.

Ao meu orientador, Professor Frederico, que desde a iniciação científica aceitou trilhar comigo meu caminho pela carreira científica. Obrigada pela paciência, pelo exemplo, por acreditar em mim e nas minhas ideias, e pela parceria de sempre. Sua confiança em mim foi o que me permitiu fazer coisas que nunca pensei que seria capaz de fazer.

À minha co-orientadora, Nathália, por estar presente mesmo estando longe. Obrigada pelos ensinamentos, pelo carinho e pelo exemplo. Quando eu crescer quero ser uma cientista tão excepcional quanto você é.

Aos meus amigos, Bella, Cristian, Iago, Matheus, Nikolle, pela motivação e pelas noitadas bem vividas. Obrigada por estarem ao meu lado quando nem eu mesma estava.

Ao meu melhor amigo Vinicius, que me motiva a ser uma cientista melhor a cada dia.

À minha família, Simone, Douglas, Luciano, Vera, Valter, Silene, Sandra, Rony, Tereza e Xisto, por serem amor mesmo na minha ausência, e por se orgulharem da pessoa que estou me tornando.

Ao meu namorado Pedro, que foi meu suporte e que me permitiu entregar o máximo durante todo o mestrado. Nada seria possível sem seu amor e cuidado.

À minha gata Givanilda, que entre miados e lambidas, trouxe alegria e graça até pros dias mais cansativos.

Agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

O consumo do álcool causa inúmeros malefícios à saúde dos consumidores devido à toxicidade dos subprodutos de seu metabolismo, e é considerado um fator de risco para o desenvolvimento de infecções pulmonares oportunistas. O objetivo do presente estudo foi caracterizar os efeitos persistentes do consumo crônico e da exposição aguda ao etanol na resposta inflamatória gerada durante a infecção por *A. fumigatus*. Para avaliação dos efeitos persistentes do consumo crônico, camundongos C57/BL6Unib foram tratados com uma solução alcoólica (20% v/v) por 12 semanas, e sua medula óssea (MO) foi transplantada para camundongos controle, não tratados, após irradiação. Após 30 dias de recuperação, esses animais foram infectados por via intranasal com  $1 \times 10^8$  conídios de *A. fumigatus* e após 48 horas foram eutanasiados. Os resultados mostram que os animais receptores de MO de animais tratados (quimera-EtOH) apresentaram um aumento da lesão pulmonar, hemorragia e morte celular. Nos pulmões, observamos uma produção aumentada de CXCL2, IL-6 e TNF- $\alpha$  nos animais quimera-EtOH, bem como uma diminuição na migração de neutrófilos para os alvéolos após a infecção, mesmo exibindo quantidades semelhantes de neutrófilos no sangue e nos pulmões. A fagocitose e depuração fúngica de neutrófilos ex vivo também estavam diminuídas nos animais quimera-EtOH. Apesar do efeito supressor expresso nos neutrófilos, os macrófagos derivados da medula óssea (BMDM) dos quimera EtOH apresentam maior capacidade depurativa e maior produção de TNF e CXCL2. Essas alterações persistem após transplante de medula óssea e vários ciclos hematopoiéticos, afetando diretamente a produção de células maduras e a resposta inflamatória adequada, o que nos leva a hipotetizar mecanismos epigenéticos que mantêm essas alterações nas células precursoras. Para avaliar o efeito da exposição aguda do etanol, expusemos a linhagem imortalizada de macrófagos, RAW 264.7, ao etanol por 48 horas. Observamos que as concentrações de 100 e 250 mM são tóxicas para as células, portanto, a seguir utilizamos concentrações não citotóxicas de etanol. Após 4 horas de estímulo, nossos dados demonstram que macrófagos expostos ao etanol apresentam capacidade diminuída de fagocitose dos conídios, depuração fúngica e produção de TNF- $\alpha$ , que pode estar relacionada à reprogramação metabólica e aumento da glicólise, demonstrada pelo aumento significativo de lactato pelas células tratadas com etanol. Podemos concluir que, independentemente da quantidade e frequência das exposições ao etanol, a capacidade do sistema imunológico de lidar com a infecção causada por *A. fumigatus* é diminuída, o que pode explicar por que pessoas com histórico de consumo de etanol apresentam uma susceptibilidade a aspergilose pulmonar, e pode representar novos mecanismos alvo para o desenvolvimento de tratamentos paliativos ou terapêuticos para a população de alcoolistas.

Palavras chave: Inflamação, álcool, aspergilose, infecção.

## ABSTRACT

Alcohol consumption causes numerous harm to the health of consumers due to the toxicity of its metabolism by-products, and is considered a risk factor for the development of opportunistic lung infections. The aim of the present study was to characterize the persistent effects of chronic consumption and acute exposure to ethanol on the inflammatory response during *A. fumigatus* infection. To assess the persistent effects of chronic consumption, C57/BL6Unib mice were treated with an alcoholic solution (20% v/v) for 12 weeks, and their bone marrow (BM) was transplanted into untreated control mice after irradiation. After 30 days of recovery, these animals were infected intranasally with  $1 \times 10^8$  conidia of *A. fumigatus* and after 48 hours they were euthanized. The results show that the animals that received MO from treated animals (EtOH-chimera) showed an increased lung injury, hemorrhage and cell death. In the lungs, we observed an increased production of CXCL2, IL-6 and TNF- $\alpha$  in the EtOH-chimera animals, besides a decrease in the of neutrophils to the alveoli after infection, even though they exhibited similar amounts of neutrophils in the blood and lungs. Phagocytosis and fungal clearance of *ex vivo* neutrophils were also decreased in EtOH-chimera animals. Despite the suppressive effect expressed on neutrophils, bone marrow-derived macrophages from the EtOH chimera have greater depurative capacity and greater production of TNF and CXCL2. These changes persist after bone marrow transplantation and several hematopoietic cycles, directly affecting the production of mature cells and an appropriate inflammatory response, which leads us to hypothesize epigenetic mechanisms that maintain these changes in precursor cells. To assess the effect of acute ethanol exposure, we exposed RAW 264.7 to ethanol for 48 hours. We observed that concentrations of 100 and 250 mM are toxic to cells, therefore, we use non-cytotoxic concentrations of ethanol below. After 4 hours of stimulation, our data demonstrate that macrophages exposed to ethanol have a reduced capacity for phagocytosis of conidia, fungal clearance and production of TNF- $\alpha$ , which may be related to metabolic reprogramming and increased glycolysis, demonstrated by the significant increase in lactate by ethanol treated cells. We can conclude that, regardless of the amount and frequency of ethanol exposures, the immune system's ability to deal with the infection caused by *A. fumigatus* is diminished, which may explain why people with a history of ethanol consumption have a susceptibility to aspergillosis, and may represent new target mechanisms for the development of therapeutic treatments for the alcoholic population.

Keywords: Inflammation, alcohol, aspergillosis, infection.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Consumo total de álcool (litros) por pessoa acima de 15 anos no mundo.

Figura 2. Metabolismo do etanol dentro das células.

Figura 3. Fotografia de uma colônia de *A. fumigatus* cultivada em YAG à 37 °C por 96 horas.

Figura 4. Esquema metodológico para a produção de animais quimerizados.

Figura 5. Análises histopatológicas pulmonares de animais quimeras após 48 horas de infecção.

Figura 6. Produção de mediadores inflamatórios após 48 horas de infecção nos animais quimera.

Figura 7. Leucograma dos animais quimera.

Figura 8. Infiltrado celular pulmonar dos animais quimerizados.

Figura 9. Infiltrado celular nos alvéolos dos animais quimerizados.

Figura 10. Fagocitose e *killing* de neutrófilos *ex vivo* estimulados com *A. fumigatus*.

Figura 11. Fagocitose, *killing* e produção de citocinas de BMDMs estimulados com *A. fumigatus*.

Figura 12. Caracterização dos efeitos persistentes do consumo crônico de etanol na medula óssea.

Figura 13. Avaliação da toxicidade celular causada pela exposição ao etanol.

Figura 14. Avaliação funcional dos macrófagos incubados com etanol.

Figura 15. Avaliação da toxicidade celular causada pela exposição ao 2-DG.

Figura 16. Avaliação do efeito da exposição ao etanol na captura de glicose e produção de lactato.

Figura 17. Dosagem da quantidade de TNF- $\alpha$  após exposição ao etanol.

Figura 18. Efeito da exposição aguda de macrófagos RAW 264.7 ao etanol.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 2-DG - 2-Deoxi-D-glicose
- ADH - álcool desidrogenase
- ALDH - aldeído desidrogenase
- BAL - lavado broncoalveolar, do inglês *bronchoalveolar lavage*
- BALF - fluido broncoalveolar, do inglês *bronchoalveolar lavage fluid*
- BMDM - macrófagos da medula óssea, do inglês, *bone marrow derived macrophage*
- CDTN - Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear
- CYP2E1 - citocromo P450 enzima 2E1
- D.O - densidade óptica
- EPO - peroxidase eosinofílica
- EtOH - etanol
- HE - Hematoxilina/Eosina
- HIF1- $\alpha$  - Induzível por Hipóxia 1 alfa, do inglês *hypoxia-inducible factor 1alpha*
- IFN $\gamma$  - interferon gama
- IL - interleucina
- LDH - lactato desidrogenase
- LPS - lipopolissacarídeo
- MA - macrófagos alveolares
- mL - mililitro
- mM - milimolar
- MPO - mieloperoxidase
- MO - medula óssea
- NAG - n-acetil glicosaminidase
- NF- $\kappa$ B - fator nuclear kappa B, do inglês *nuclear factor kappa B*
- PAMPs - padrões moleculares associados a patógenos, do inglês *Pathogen-associated molecular pattern*
- PBS - Tampão fosfato-salino, do inglês *phosphate buffered saline*
- ROS - espécies reativas de oxigênio, do inglês *reactive oxygen species*
- PRRs - receptores de reconhecimento de padrões, do inglês *pattern recognition receptors*

RCF - força centrífuga relativa, do inglês *Relative Centrifugal Force*, ou força g.

SFB - soro fetal bovino

TLR - receptor do tipo toll, do inglês *Toll-like receptor*

TNF- $\alpha$  - fator de necrose tumoral alfa, do inglês *tumor necrosis factor alpha*

UFC - unidades formadoras de colônia

$\mu\text{L}$  - microlitro



## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>16</b>
<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>25</b>
<b>CAPÍTULO I - Efeitos permanentes da exposição crônica ao etanol na resposta inflamatória gerada pela infecção por <i>A. fumigatus</i></b>	<b>26</b>
<b>OBJETIVO</b>	<b>26</b>
<b>METODOLOGIA</b>	<b>26</b>
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>32</b>
<b>CAPÍTULO II - Efeitos da exposição aguda ao etanol na resposta inflamatória gerada pela infecção por <i>A. fumigatus</i></b>	<b>46</b>
<b>OBJETIVO</b>	<b>46</b>
<b>METODOLOGIA</b>	<b>46</b>
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>48</b>
<b>CONCLUSÃO</b>	<b>56</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>57</b>
<b>ANEXO A</b>	<b>66</b>

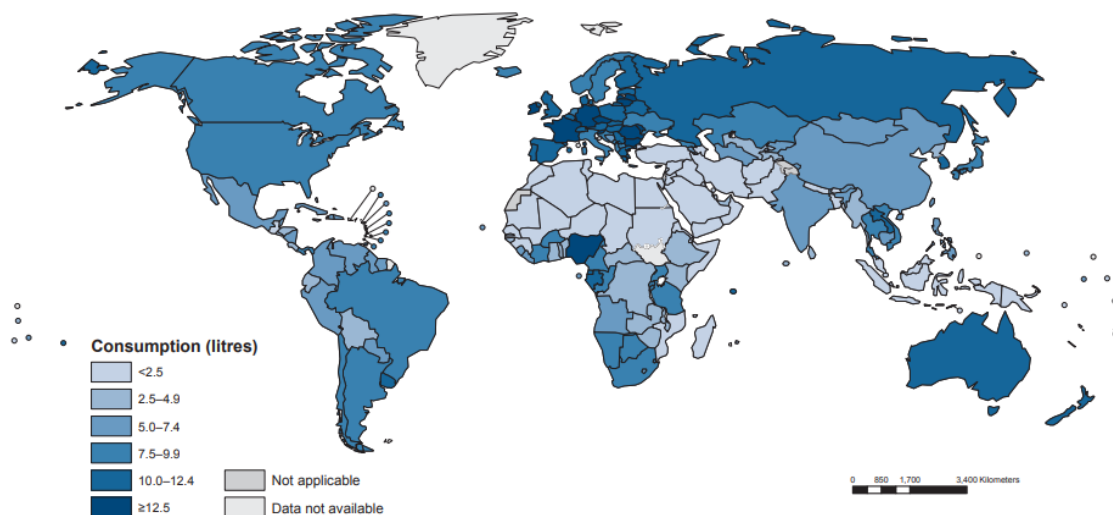
## INTRODUÇÃO

### Consumo de etanol

As evidências das primeiras preparações de bebidas alcoólicas através da fermentação de grãos apresentavam caráter ritualístico e datam de 9.000-8.700 anos antes de Cristo, na China, após o estabelecimento da cultura sedentária entre os humanos (Wang et al. 2021). Desde então, o consumo do etanol tem sido relacionado a práticas religiosas, produção alimentícia e à medicina (Khaderi, 2019). Hoje, o álcool é considerado uma droga de abuso por modificar as funções fisiológicas e psicológicas dos consumidores, sendo disponibilizado no mercado, de forma lícita, para compra na maioria dos países (Gilmore et al., 2016).

Dados da Organização Mundial da Saúde revelam que aproximadamente 2,3 bilhões de pessoas no mundo consomem etanol frequentemente (WHO, 2018). Cerca de 6,4 litros de etanol são consumidos por pessoas acima de 15 anos na população mundial, porém, se considerarmos apenas as pessoas que consomem álcool frequentemente, a média de litros consumidos por ano sobe para 15,1 litros por pessoa (WHO, 2018). Podemos observar ainda, que algumas regiões do planeta apresentam uma grande variação no consumo de etanol decorrente das diferenças culturais, sociodemográficas e econômicas (Figura 1).

O Brasil apresenta uma média de consumo de litros de etanol por pessoa acima de 15 anos maior que a média global, 7.8 litros por ano (Figura 1) (WHO, 2018). A Pesquisa Nacional de Saúde de 2019 revelou que mais de um quarto da população adulta brasileira consome álcool pelo menos uma vez na semana e 17,1% apresentaram consumo abusivo da substância nos 30 dias que antecederam a entrevista (IBGE, 2020).



**Figura 1. Consumo total de álcool (litros) por pessoa acima de 15 anos no mundo.** Adaptado do Relatório de status global sobre álcool e saúde da Organização Mundial da Saúde em 2018.

Em 2010, membros do Comitê Científico Independente sobre Drogas classificaram o álcool como a droga mais prejudicial no Reino Unido (Nutt et al., 2010). Mundialmente, mais de 5% das mortes relatadas em 2016 estavam associadas ao consumo de etanol (WHO, 2018). As mortes ligadas ao consumo do etanol estão relacionadas às lesões causadas intencionalmente ou não, como suicídios e acidentes de carro, neoplasias malignas, doenças cardiovasculares, diabetes, cirroses e doenças infecciosas (Rehm et al., 2003; WHO, 2018).

A frequência e quantidade de consumo podem ter diferentes efeitos ao organismo dos consumidores, estando classificados entre: dependência de álcool, quando são desenvolvidos um conjunto de fenômenos comportamentais, cognitivos e fisiológicos após o uso crônico de álcool, ou consumo agudo, quando são consumidos altos volumes de álcool em uma única ocasião (CISA, 2021). O abuso e/ou dependência é caracterizado pela perda de controle sobre o consumo de álcool e já é considerada uma doença crônica e incapacitante (Witkiewitz et al., 2019).

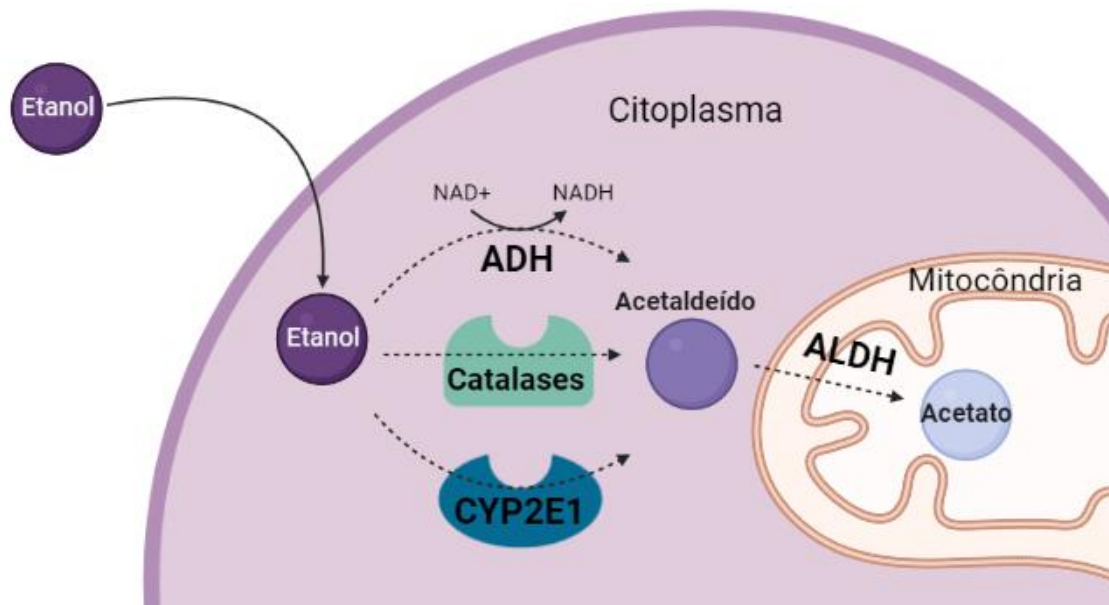
Em 2019, a pandemia provocada pelo vírus causador da síndrome respiratória aguda grave, o SARS-CoV-2, demandou medidas sociais paliativas para diminuir a disseminação da doença, como o isolamento social (Killgore et al., 2021). Durante este período, o volume e a frequência de consumo do álcool aumentaram significativamente dentro do grupo de pessoas sob isolamento, o que pode gerar impactos diretos nos casos de desordens causadas pelo uso do álcool em todo mundo (Killgore et al., 2021; Bailey et al., 2021).

### **Metabolismo do etanol**

Após a ingestão, o álcool é absorvido por difusão passiva, em grande parte pelo intestino delgado (Cederbaum, 2012; Hernández et al., 2016). Seu metabolismo é realizado principalmente nas células do fígado, mas também acontece em menor escala pelas células estomacais, intestinais e pulmonares (Levitt et al., 1997; Lee et al., 2006). Nos pulmões, a depender da quantidade ingerida, podemos observar a metabolização de etanol em seus subprodutos (Bernstein, 1992). Essa associação aumenta o estresse oxidativo encontrado no órgão e se relaciona diretamente com a imunomodulação das doenças respiratórias (Kaphalia & Calhoun, 2013).

Por ser uma molécula pequena, capaz de atravessar passivamente as membranas

celulares, é rapidamente metabolizada em acetaldeído (i) por oxidação pela enzima álcool desidrogenase (ADH) no citoplasma, com  $\text{NAD}^+$  como coenzima, (ii) pelo sistema microsomal oxidante do etanol, o citocromo P450 enzima 2E1 (CYP2E1) localizado no retículo endoplasmático, e (iii) pela via das catalases (Figura 2) (Haseba et al., 2020; Norberg et al., 2003; Lieber, 1996).



**Figura 2. Metabolismo do etanol dentro das células.** O etanol entra de forma passiva nas células, no citoplasma é oxidado a acetaldeído pela enzima ADH, pelo citocromo CYP2E1 ou por catalases. Na mitocôndria, o acetaldeído é convertido a acetato pela ALDH.

O acetaldeído gerado é extremamente tóxico para as células, então se torna essencial sua conversão a acetato pela enzima aldeído desidrogenase (ALDH), na mitocôndria (Figura 2) (Zhu et al., 2021; Rajendram et al. 2016; Hernández et al., 2016). O acúmulo de acetaldeído gera reações adversas como náuseas, rubor facial e taquicardia, e é dependente da velocidade de sua conversão em acetato, sendo influenciada por polimorfismos no gene *ALDH* (Edenberg, 2007; Gross, 2015). Por sua vez, o acetato produzido é destinado a outros processos metabólicos, como o ciclo de Krebs, porém, tanto o acetato quanto o acetaldeído induzem o aumento do dano celular (Kendrick et al., 2010, Brooks et al., 2013). Desta forma, ao longo dos anos, o etanol e os subprodutos de seu metabolismo vêm sendo associados ao aumento do risco de desenvolvimento de diversos tipos de câncer, doenças cardiovasculares, hepáticas e infecciosas (Minzer et al., 2020; Cederbaum, 2012; Kendrick, 2010; Bagnardi et al., 2001).

## **Implicações do consumo de etanol nas infecções**

As alterações na regulação das respostas inflamatórias em indivíduos alcoolistas os predispõem a infecções causadas por patógenos pulmonares, que nestes casos, apresentam sintomas mais agressivos, um aumento da morbidade e da mortalidade (Happel & Nelson, 2005). Este fenótipo advém das várias alterações nos mecanismos de proteção das vias aéreas que são afetados pelo consumo excessivo do etanol, como a disfunção causada nos cílios do aparelho mucociliar respiratório (Happel & Nelson, 2005). Este sistema garante a interceptação e eliminação de partículas que entram junto com o ar nos pulmões, o que facilita o contato dos microrganismos com o espaço alveolar e aumenta as chances do estabelecimento de uma infecção (Price et al., 2018; Samuelson et al., 2017; Sisson, 2007).

O reconhecimento dos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) por meio dos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) são gatilhos para inflamação durante o processo infeccioso, e dão início à uma série de respostas essenciais para o combate aos patógenos (Takeuchi et al., 2010). Além de afetar as barreiras físicas do pulmão, o consumo de etanol modula a resposta inflamatória gerada pelos patógenos, modificando significativamente a resposta inicial do hospedeiro, porém, a quantidade e frequência do consumo do etanol parecem ter efeitos opostos na modulação do sistema imune (Kany et al., 2019).

Oak e colaboradores demonstraram que a exposição aguda ao etanol está associada à inibição da ativação do fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) pelo receptor *Toll-like* 4 (TLR4) em monócitos humanos, representando uma via de supressão inflamatória da produção do fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) após estímulo com lipopolissacarídeo (LPS) (Oak et al., 2006). Zhou e colaboradores, corroboram estes dados e demonstram que o consumo agudo do etanol inibe a ativação de TLR4 por LPS em células epiteliais intestinais, resposta que é essencial para o reconhecimento de antígenos luminais e progressão da resposta imunológica intestinal (Zhou et al, 2013).

Em contraste, macrófagos advindos de humanos consumistas crônicos de etanol apresentaram expressão aumentada de interferon gama (IFN $\gamma$ ) e interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) após estímulo com LPS, que estão associadas a um aumento da resposta pró-inflamatória (Gaydos et al., 2016). No fígado, o consumo crônico de etanol está associado ao aumento da expressão e da responsividade de TLR4 ao LPS, induzindo o aumento da produção de TNF- $\alpha$  e ao dano hepático gerado pela inflamação no tecido (Gustot et al., 2006). Esse efeito hiper-responsivo

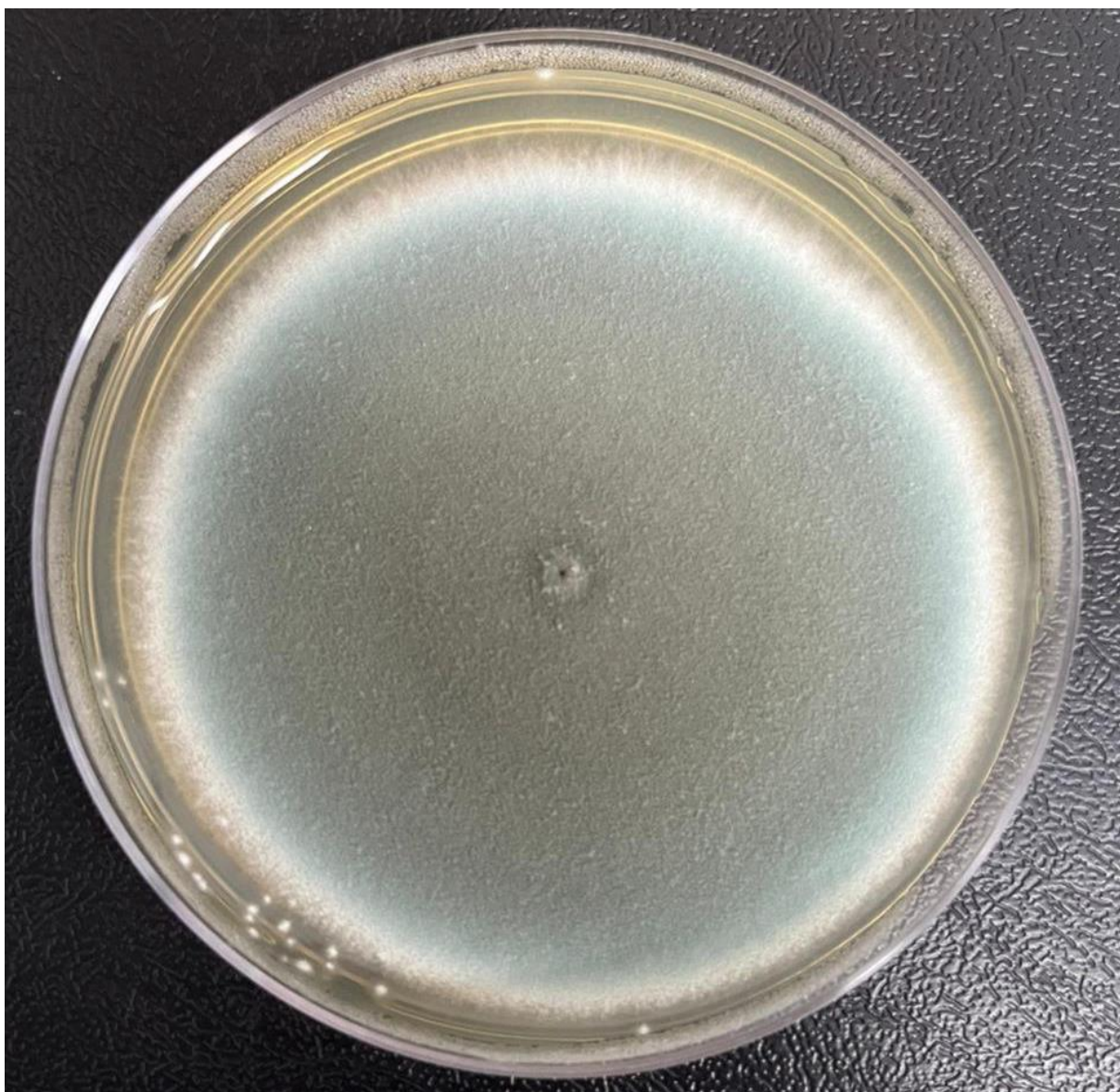
aos estímulos, observado durante o consumo crônico, parece estar associado ao aumento da acessibilidade de fatores de transcrição às regiões reguladoras de genes pró-inflamatórios na cromatina, induzindo o aumento da expressão destes genes e da resposta inflamatória (Lewis et al., 2022).

Ainda, a combinação do consumo crônico com uma dose aguda de etanol aumenta a produção de CXCL1, CXCL2 e CXCL15 no pulmão, resultando no aumento da migração de neutrófilos e dano pulmonar mesmo na ausência de qualquer estímulo secundário (Poole et al., 2019). Deste modo, os fatores que contribuem para a alteração da regulação da expressão dos mediadores inflamatórios podem diferir, apresentando caráter mais prolongado, quando associado a alterações epigenéticas que permitem a maior acessibilidade à cromatina, ou caráter mais agudo, quando associada à alterações inibitórias geradas pela alteração no metabolismo celular (McTernan et al., 2022; Malherbe & Messaoudi, 2022; Morris et al., 2022; Curtis et al., 2013).

Podemos observar que a relação modulatória da resposta inflamatória causada pelo consumo do etanol varia de acordo com o estímulo, o tempo e frequência de exposição, porém, contemplamos um consenso: o consumo do álcool é fator de risco para infecções pulmonares causadas por bactérias, vírus e fungos (Malacco et al., 2020; Gaydos et al., 2019; Yeligar et al., 2016). Em artigo recente publicado pelo nosso grupo de pesquisa, demonstramos que o consumo crônico de álcool prejudica a resposta imunológica do hospedeiro contra a infecção causada por *Aspergillus fumigatus* (Malacco et al., 2020). Após doze semanas de tratamento com etanol e subsequente infecção fúngica, os camundongos consumistas apresentaram um quadro inflamatório desregulado, com um aumento da produção de CXCL2 nos alvéolos e de CXCL1 no sangue, acompanhada por uma diminuição da expressão de CXCR2 e CD11b nos neutrófilos (Malacco et al., 2020). A migração e ativação dos neutrófilos é essencial no combate à infecção fúngica e contenção da germinação dos conídios (Tischler et al., 2019). Em nosso modelo, os neutrófilos dos animais tratados cronicamente com etanol apresentam a atividade depurativa, fagocítica e de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) diminuídas. Além disso, a diminuição da migração de neutrófilos, decorrentes da diminuição da produção de CXCR2 e CD11b, permitiu a invasão do tecido pulmonar pelas hifas fúngicas e o aumento da letalidade nos animais consumistas (Malacco et al., 2020).

### **O patógeno *Aspergillus fumigatus***

*A. fumigatus* é o patógeno mais comum em casos de aspergilose pulmonar, estando presente em 90% dos casos humanos diagnosticados, é um fungo filamentosos, ubíquo e saprofítico que desempenha uma função importante na decomposição de carbono e nitrogênio na natureza (Latgé & Chamilos, 2019; Latgé, 1999). Apresenta colônia de crescimento radial, com micélio hialino e produção de conídios mielinizados, com coloração esverdeada (Figura 3).



**Figura 3.** Fotografia de uma colônia de *A. fumigatus* cultivada em YAG à 37 °C por 96 horas.

Uma de suas características mais marcantes é a produção em larga escala de pequenos conídios (2 a 3  $\mu\text{m}$ ), que são capazes de resistir a altas temperaturas e a diferentes estresses

(Latgé, 1999). Os conídios de *A. fumigatus* são cobertos por uma camada de hidrofobinas, como a melanina, que inicialmente mascaram o reconhecimento das células fúngicas (Aimanianda et al., 2009; Nosanchuk & Casadevall, 2006). Porém, a remoção desta camada, processo fundamental para germinação e crescimento fúngico, expõem a camada central de polissacarídeos, como  $\beta$ -(1,3)-glucanas, galactosaminas e quitina, que são reconhecidos pelos PRRs das células imunes inatas (Latgé et al., 2017; Erwig et al., 2016)

Os conídios são facilmente aerotransportados para as vias aéreas dos hospedeiros, onde entram em contato com o epitélio das vias aéreas e com a superfície alveolar. O sistema mucociliar produz uma ampla gama de peptídeos antimicrobianos no muco que impedem a passagem do patógeno, mas caso os conídios cheguem até os alvéolos, os macrófagos alveolares (MA) irão fagocitá-los, dando início a uma resposta pró inflamatória essencial ao combate de *A. fumigatus* (Margalit & Kavanagh, 2015).

O reconhecimento dos PAMPs fúngicos por TLR4, TLR2 e Dectina-1, induz a produção de mediadores inflamatórios seguidos da fagocitose, o método inicial de defesa contra patógenos fúngicos (Tischler et al., 2019; Bochud et al., 2008; Balloy et al., 2006). Inicialmente, são produzidas uma gama de quimiocinas e citocinas responsáveis por mediar a resposta inflamatória, como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8, e ligantes de CXCR2, como CXCL1 e CXCL2, responsáveis pela quimiotaxia de neutrófilos (Erwig et al., 2016). Os neutrófilos, por sua vez, apresentam uma série de mecanismos para depurativos contra os conídios e as hifas, como a fagocitose, produção de ROS, degranulação e produção de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) (Mircescu et al., 2009). Dessa maneira, uma pessoa imunocompetente é capaz de eliminar o fungo de seus alvéolos antes que ele consiga invadir o tecido e causar aspergilose pulmonar invasiva. Porém, uma resposta inflamatória deficitária no número e na ativação de neutrófilos e macrófagos, como é o caso de indivíduos neutropênicos, pacientes em programas quimioterápicos ou alcoolistas, toda a montagem da resposta inflamatória é prejudicada e o fungo consegue crescer no parênquima pulmonar e causar a doença (Tischler et al., 2019; Malacco et al., 2020). Esse aumento de susceptibilidade a infecções fúngicas pulmonares na população de alcoolistas ainda é mal compreendido, mas sabe-se que a diminuição de migração e ativação de neutrófilos e macrófagos é fator primordial para o desenvolvimento da doença.

### **A aspergilose na população alcoolista**



As infecções fúngicas contribuem significativamente para a mortalidade humana em todo mundo. Ainda assim, o tratamento, diagnóstico e os estudos dos fatores de risco para o desenvolvimento dessas doenças são negligenciados (Brown et al., 2012). A correlação entre o consumo de álcool e *Aspergillus* aparece pela primeira vez na literatura em 1978, quando um estudo de caso demonstrou o diagnóstico de aspergilose invasiva em um homem alcoolista (Blum et al., 1978). Desde então, alguns artigos associam as doenças hepáticas alcoólicas, como hepatite e cirrose, à maior susceptibilidade de desenvolvimento da aspergilose pulmonar invasiva (Gustot et al., 2014; Jurissen et al., 2013). Em estudo publicado por Suwatanapongch e colaboradores, em 2021, três dos quatro pacientes com manifestações de aspergilose pulmonar invasiva na tomografia computadorizada relataram consumo frequente de álcool (Suwatanapongched et al., 2021).

O consumo do etanol afeta diretamente vários mecanismos inflamatórios essenciais para o combate ao fungo que foram citados anteriormente, como a produção de receptores e mediadores inflamatórios, fagocitose e migração celular (Kany et al., 2019). Porém, os mecanismos pelos quais o álcool e os subprodutos de seu metabolismo afetam a resposta imune inflamatória na infecção por *A. fumigatus* ainda são pouco explorados na literatura, e são o foco do nosso grupo de pesquisa.

## JUSTIFICATIVA

O álcool é uma das drogas psicotrópicas mais consumidas no mundo, e além de ser disponibilizada licitamente na maioria dos países, está associada a uma série de doenças, complicações e mortes. Durante a pandemia, o volume e a frequência de consumo do álcool aumentaram significativamente, o que pode agravar o número de pessoas afetadas no mundo todo. O abuso do consumo de etanol é um fator de risco para o desenvolvimento de infecções pulmonares, pois além de alterar as barreiras físicas de controle da entrada de patógenos, como o aparelho mucociliar, modula a resposta inflamatória necessária para o combate às infecções. A frequência e quantidade de etanol parecem apresentar efeitos contrastantes nos indivíduos, especialmente na resposta imune inflamatória, e por este motivo, vários estudos têm buscado entender a patofisiologia das infecções na população alcoolista. Animais consumistas crônicos de etanol são mais susceptíveis a infecção causada pelo fungo filamentoso *A. fumigatus*. Este fenótipo de susceptibilidade é principalmente representado pela diminuição da capacidade dos leucócitos de montar uma resposta adequada para combater o patógeno. Neste sentido, ainda não são compreendidos os efeitos permanentes do consumo crônico de etanol ou os efeitos da exposição aguda para a montagem de uma resposta inflamatória causada por *A. fumigatus*. Caracterizar esses efeitos pode fornecer novos conhecimentos sobre os mecanismos relacionados à susceptibilidade de consumistas abusivos de álcool a infecções pulmonares como a aspergilose, além de possibilitar a identificação de potenciais alvos farmacológicos para intervenções terapêuticas e preventivas direcionadas ao grupo de pacientes com transtornos no uso do álcool.

## CAPÍTULO I - Efeitos permanentes da exposição crônica ao etanol na resposta inflamatória gerada pela infecção por *A. fumigatus*

### OBJETIVO

Investigar e caracterizar nas células hematopoiéticas, as modulações inflamatórias persistentes decorrentes do consumo crônico de etanol e as consequências para a resposta imune inflamatória frente a infecção por *Aspergillus fumigatus*.

#### Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos persistentes da exposição ao etanol na produção de leucócitos pela medula óssea após a quimerização.
- Avaliar o perfil inflamatório pulmonar dos animais quimerizados e infectados com *A. fumigatus*.
- Investigar as funções efetoras de macrófagos e neutrófilos produzidos pela medula óssea dos animais quimerizados.
- Correlacionar as alterações encontradas nas funções celulares com o perfil inflamatório.

### METODOLOGIA

#### Manejo animal e tratamento crônico de consumo de etanol

Camundongos machos da linhagem C57BL/6JUnib, de 5-8 semanas de idade, advindos do Biotério Central da UFMG, passaram por protocolos de eutanásia e manejo aprovados pelo Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA UFMG, submetido e aprovado sob número de protocolo 271/2019 (ANEXO I). Os animais foram agrupados em 5 animais por microisolador, com volume médio de maravalha e mantidos sob protocolo de iluminação por 12 horas e 12 horas de claro/escuro no Biotério do Departamento de Genética, Ecologia e Evolução do ICB/UFMG. A alimentação e líquidos foram disponibilizados de forma irrestrita, a temperatura foi controlada e não houve enriquecimento ambiental.

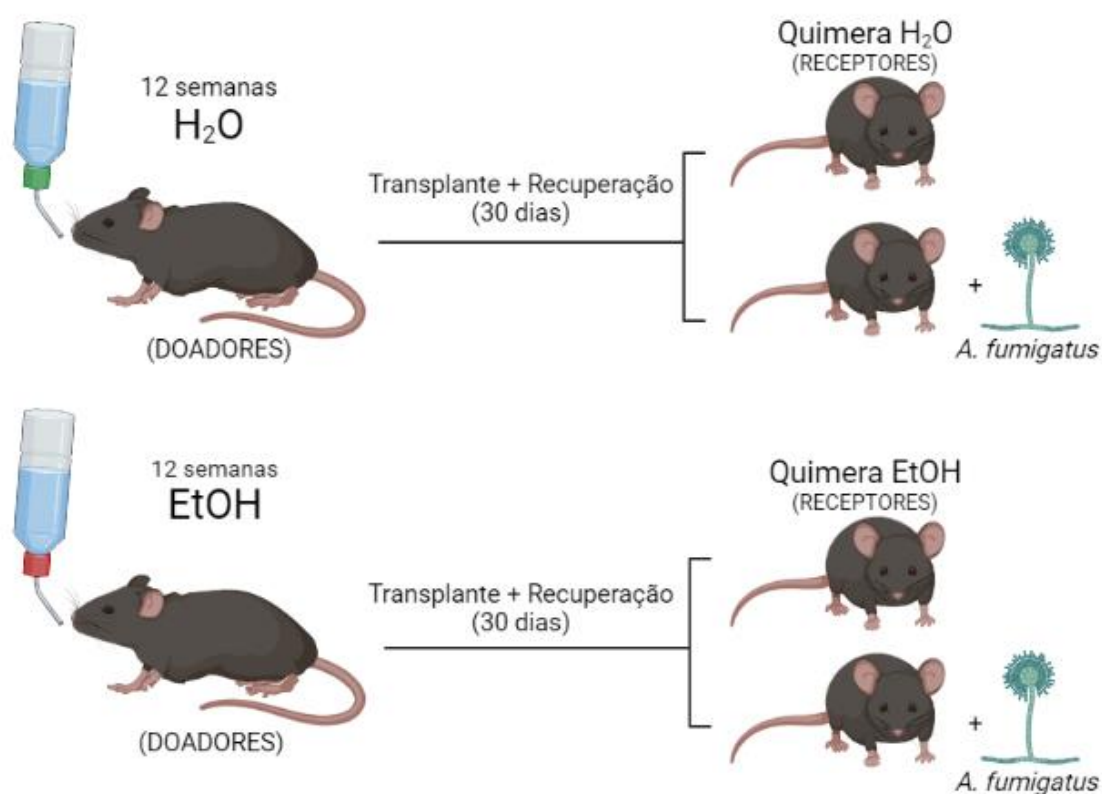
O modelo de consumo de etanol foi descrito por Yeligar e colaboradores em 2012 e reproduz a concentração sanguínea de álcool após o consumo crônico em indivíduos humanos

(Yeligar et al., 2012). Os camundongos doadores, com 5-6 semanas de idade, tiveram disponível, exclusivamente, uma solução aquosa contendo etanol (EtOH) durante 12 semanas. Na primeira semana a solução continha 5% (v/v) de teor alcoólico, na segunda semana a solução continha 10% (v/v) de teor alcoólico e nas dez semanas seguintes a solução continha 20% (v/v) de EtOH. As duas primeiras semanas serviram como um processo de adaptação ao consumo da substância. Os animais do grupo controle receberam água durante esse período (Figura 4).

### **Transplante de medula óssea**

Ao final das 12 semanas de tratamento, os animais doadores de medula óssea (MO) foram eutanasiados por sobredose de anestésico (300 mg/kg de quetamina e 24 mg/kg de xilazina) via intraperitoneal (i.p.). Das patas traseiras dos camundongos foram retirados os fêmures e tíbias. Dentro do fluxo laminar, as epífises foram removidas com auxílio de um bisturi e a MO foi separada dos ossos através de lavagens utilizando agulha e seringa contendo 3 mL de meio RPMI estéril (CultiLab). As células foram centrifugadas a 201 RCF por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células foi ressuspensão em 10 mL de meio RPMI estéril. Foram realizadas diluições seriadas (1:200) em corante de Turk para a contagem das células em câmara de Neubauer. As células foram novamente centrifugadas e ressuspensas em solução salina estéril gelada para a concentração desejada.

A medula óssea foi inoculada via intravenosa nos animais receptores previamente irradiados na concentração de  $1 \times 10^7$  células em 100  $\mu$ L (Rezende et al. 2017). No Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN) da UFMG, os animais receptores C57BL/6JUnib com 8 semanas de idade foram irradiados em duas sessões, com 4 Grays cada, e com intervalo de 2 horas entre as sessões para minimizar os danos gastrointestinais. Após o transplante, os receptores receberam tratamento com o antibiótico ciprofloxacina por 15 dias para evitar infecções. A recolonização da medula foi observada de sete em sete dias através de contagem de células em esfregaços sanguíneos (Figura 4).



**Figura 4. Esquema metodológico para a produção de animais quimerizados.** Após as 12 semanas de tratamento com etanol ou água, os camundongos C57BL6/J Unib doadores foram eutanasiados e a medula foi transplantada para os animais receptores C57BL6/J Unib irradiados. Após 30 dias de recuperação os camundongos foram infectados  $1 \times 10^8$  conídios de *A. fumigatus* e 48 horas após a infecção os camundongos foram eutanasiados para a coleta de material biológico.

### Inóculo e infecção

Os conídios da linhagem A1163 de *A. fumigatus* foram estriados em placas de 20 mL de meio completo sólido YAG (2% p/v de glicose, 2% p/v de ágar, 0.5% p/v de extrato de levedura e elementos traço) e incubados por 48 horas a 37°C (Soriani et al, 2008; Schoch et al., 2020). Os conídios foram ressuspensos em solução de Tampão fosfato-salino (PBS) 1X estéril e separados do micélio através de filtração em gazes estéreis. A solução contendo os conídios foi centrifugada a 652 RCF, por 10 minutos, em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspense em 1 mL de PBS 1X estéril. Foram realizadas diluições seriadas (1:10.000) para a contagem dos conídios na câmara de Neubauer e o inóculo foi preparado em solução de PBS 1X estéril.

Após 30 dias da recuperação do transplante os animais foram infectados via intranasal

com  $1 \times 10^8$  conídios em 40  $\mu$ L com o auxílio da pipeta, para isso os animais foram anestesiados com 5% isoflurano por, aproximadamente, 30 segundos (Malacco et al. 2019).

#### Letalidade

Para a análise de susceptibilidade à infecção fúngica, os camundongos foram infectados com  $1 \times 10^8$  conídios de *A. fumigatus*. O peso dos animais foi acompanhado a cada 24 horas durante 9 dias. Quando houve perda de peso maior que 20% do peso inicial, o camundongo foi eutanasiado por sobredose de anestésico.

#### Cultura celular e fagocitose

Os macrófagos da medula óssea, ou BMDMs (do inglês, *bone marrow derived macrophages*), foram obtidos do fêmur de ambos os grupos de animais quimerizados após a recuperação do transplante. Os animais foram eutanasiados por sobredose de anestésico, os fêmures foram retirados em fluxo laminar e tiveram suas epífises cortadas com bisturi estéril. Em tubos de 15 mL individuais e com auxílio de seringa, agulha a MO de cada animal foi removida dos ossos e ressuspensa em 5 mL de *Dulbecco 's Modified Eagle* (DMEM) (CultiLab) Completo (30% sobrenadante de L929 filtrado, 20% de Soro Fetal Bovino e 50% de DMEM). As células foram centrifugadas por 10 min, a 258 RCF, a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensa em 5 mL de DMEM completo. As células foram colocadas em garrafas de cultivo grandes e foram adicionados mais 25 mL de meio completo por garrafa. As células foram cultivadas em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> à 37°C. Após 4 dias, foram adicionados mais 25 mL de meio completo às garrafas e elas retornaram à estufa (Trouplin et al, 2013). O sobrenadante de L929, uma linhagem celular de fibroblastos, contém componentes que induzem a diferenciação das células hematopoiéticas em macrófagos, como o M-CSF, um fator de crescimento para macrófagos (Heap et al., 2021). A diferenciação das células da MO em BMDMs foi observada após a aderência das células no fundo da garrafa e formação de monocamada.

Para avaliação do índice fagocítico, os BMDMs foram adicionados a placas de cultura de 24 poços contendo lamínulas de vidro estéreis. Foram plaqueadas  $1 \times 10^5$  células por poço no volume de 500  $\mu$ L de DMEM completo. As células foram incubadas *overnight* na estufa para garantir a adesão das células às lamínulas. No dia seguinte, o sobrenadante da placa foi retirado e substituído por 500  $\mu$ L de DMEM, sem antibiótico e sem antifúngico, contendo 2,5% de soro fetal bovino e  $5 \times 10^5$  conídios de *A. fumigatus*. Os poços controle receberam o meio com ausência do fungo. Após 4 horas de exposição ao fungo, o sobrenadante das células foi coletado e armazenados à -20°C, as células foram lavadas com 1 mL de PBS 1x a 37°C, as lamínulas

foram coradas com kit panótico rápido (Laborclin), seguindo protocolo descrito pelo fabricante, e adicionada as lâminas.

Para a avaliação de fagocitose dos neutrófilos *ex vivo*, os camundongos quimerizados não infectados foram eutanasiados e o fêmur foi retirado. A MO foi removida através de lavagens com meio RPMI e as células polimorfonucleares foram separadas do restante da medula por gradiente de densidade utilizando Histopaque 1077 e 1119. Após a separação, foram semeados  $1 \times 10^6$  neutrófilos por poço em placas de 96 poços e subsequentemente foram adicionados  $5 \times 10^6$  conídios de *A. fumigatus* por poço. Após 4 horas de exposição, as células foram centrifugadas, em citocentrífuga, por 5 minutos a 18 RCF, para a montagem das lâminas. As lâminas foram coradas com o kit Panótico rápido (Laborclin) seguindo protocolo descrito pelo fabricante e em seguida observadas em microscópio óptico.

O índice fagocítico de neutrófilos e BMDMs foi calculado a partir da quantidade de células contendo pelo menos um conídio em seu citoplasma em relação ao total de células contadas após as 4 horas de exposição ao fungo. A quantificação da porcentagem de fagocitose *in vivo* foi realizada nas lâminas das células do lavado bronco alveolar (BALF), através da contagem das células contendo pelo menos um conídio em seu citoplasma.

### **Lavado broncoalveolar e contagem celular**

Dois dias após a infecção, os grupos de animais infectados e controles foram eutanasiados por sobredose de anestésico (300 mg/kg de quetamina e 24 mg/kg de xilazina). A traqueia foi exposta e canulada para a realização do lavado broncoalveolar (BAL) e coleta do fluido (BALF). O sobrenadante foi armazenado em freezer  $-20^{\circ}\text{C}$  para futuras análises de citocinas, quimiocinas, dano celular e proteínas totais, enquanto o *pellet* de células foi ressuspenso em 100  $\mu\text{L}$  de PBS 1X. As células foram diluídas em corante de Turk (1:10) para a contagem das células totais na câmara de Neubauer. O restante das células foi centrifugado na citocentrífuga por 5 minutos a 18 RCF, para a montagem de lâminas contendo  $7 \times 10^5$  células. As lâminas foram coradas com o kit Panótico rápido (Laborclin) seguindo protocolo descrito pelo fabricante e em seguida observadas em microscópio óptico. Para a quantificação diferencial das células no BALF, foram contadas 300 células, diferenciadas por critérios morfológicos e de coloração. A quantidade de cada tipo celular foi calculada a partir da porcentagem encontrada em relação ao número total de células.

Ambos os pulmões foram retirados e macerados. O acúmulo tecidual de células foi avaliado indiretamente pela atividade de enzimas específicas de cada tipo celular. A saber: n-

acetilglicosaminidase (NAG) relativa a macrófagos, mieloperoxidase (MPO) relativa a neutrófilos e peroxidase eosinofílica (EPO) relativa a eosinófilos (Huang et al. 2016; Barcelos et al. 2005; Strath et al. 1985)

### **Lesão pulmonar**

Após 48h de infecção, os grupos de animais infectados e controles foram eutanasiados por sobredose de anestésico. O pulmão esquerdo foi retirado e armazenado em formalina 4% (v/v) para as análises histológicas. Antes do emblocamento, o tecido passou por etapas de desidratação em álcool, diafanização em xilol e inclusão na parafina. Os blocos foram cortados em micrótomo, os tecidos nas lâminas foram coroados pela coloração Hematoxilina/Eosina (HE) e observados em microscópio óptico. O escore histopatológico foi realizado com base em critérios de edema, infiltrado inflamatório e hemorragia.

Para a determinação do dano tecidual gerado nos camundongos quimerizados após a infecção, foi dosada as quantidades da enzima Lactato Desidrogenase no BALF utilizando o *kit* de método enzimático cinético de Desidrogenase Láctica (LDH) (Bioclin), com avaliação da e a densidade óptica (D.O.) em espectrofotômetro a 340 nm.

### **Hemograma**

O sangue foi retirado da veia cava inferior com auxílio de pipeta *Pasteur* embebida em EDTA e armazenado em tubos estéreis contendo EDTA. Para avaliação de células totais e diferenciais, foram realizadas leituras do sangue em contador hematológico veterinário MEK-6550 (Celltac Alpha). Após as leituras, o sangue foi centrifugado a 805 RCF, por 10 minutos, a 4°C, o plasma foi coletado e armazenado a -20°C.

### **Dosagem de mediadores inflamatórios**

A avaliação dos níveis das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  e IL-10 e das quimiocinas CXCL1 e CXCL2 foi realizado do sobrenadante do BALF e do macerado de pulmão, coletados dois dias após a infecção, pelo método imunoenzimático de ELISA sanduíche utilizando anticorpos murinos específicos. O ensaio foi realizado de acordo com as especificações do fabricante (R&D Systems). O produto das marcações foi avaliado em espectrofotômetro a 492 nm e a concentração calculada a partir da D.O. da curva padrão e das amostras.

### **Carga fúngica**

Para análise da quantidade de unidades formadoras de colônia (UFC) *in vivo*, o pulmão



direito foi retirado de forma estéril, macerado com auxílio de almofariz e pistilo em 1 mL de PBS 1X estéril. O macerado foi diluído (1:1000) e 100 µL da solução foram semeados em meio completo YAG. As placas foram incubadas por 18 horas a 37°C e as UFC foram mensuradas (Malacco, 2019).

Para as análises da quantidade de UFC *ex vivo*, neutrófilos ( $1 \times 10^6$ ) e BMDMs ( $1 \times 10^5$ ) foram incubadas por 6 horas com *A. fumigatus* na proporção de 1 célula para cada 5 conídios. Após a incubação as células foram lisadas com 1 mL de água de injeção gelada, diluídas em salina (1:1000) e 100 µL da solução foram semeados em meio completo YAG. As placas foram incubadas por 18 horas a 37°C e as UFC foram mensuradas.

### **Análises estatísticas**

A construção de gráficos e análises estatísticas dos dados obtidos foram realizadas através do software GraphPad Prism versão 8.0. As análises entre as diferenças de mais de dois grupos experimentais foram determinadas pela análise de variância de uma via (*One Way* – ANOVA) seguidas pelo pós teste de *Tukey*. As análises de diferenças entre dois grupos foram analisadas por teste *t student*. O teste de *Long Rank* foi utilizado para a análise da curva de sobrevivência. Os dados foram considerados estatisticamente diferentes se  $p < 0,05$ .

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### ***Animais quimera EtOH apresentam maior lesão pulmonar durante infecção por A. fumigatus***

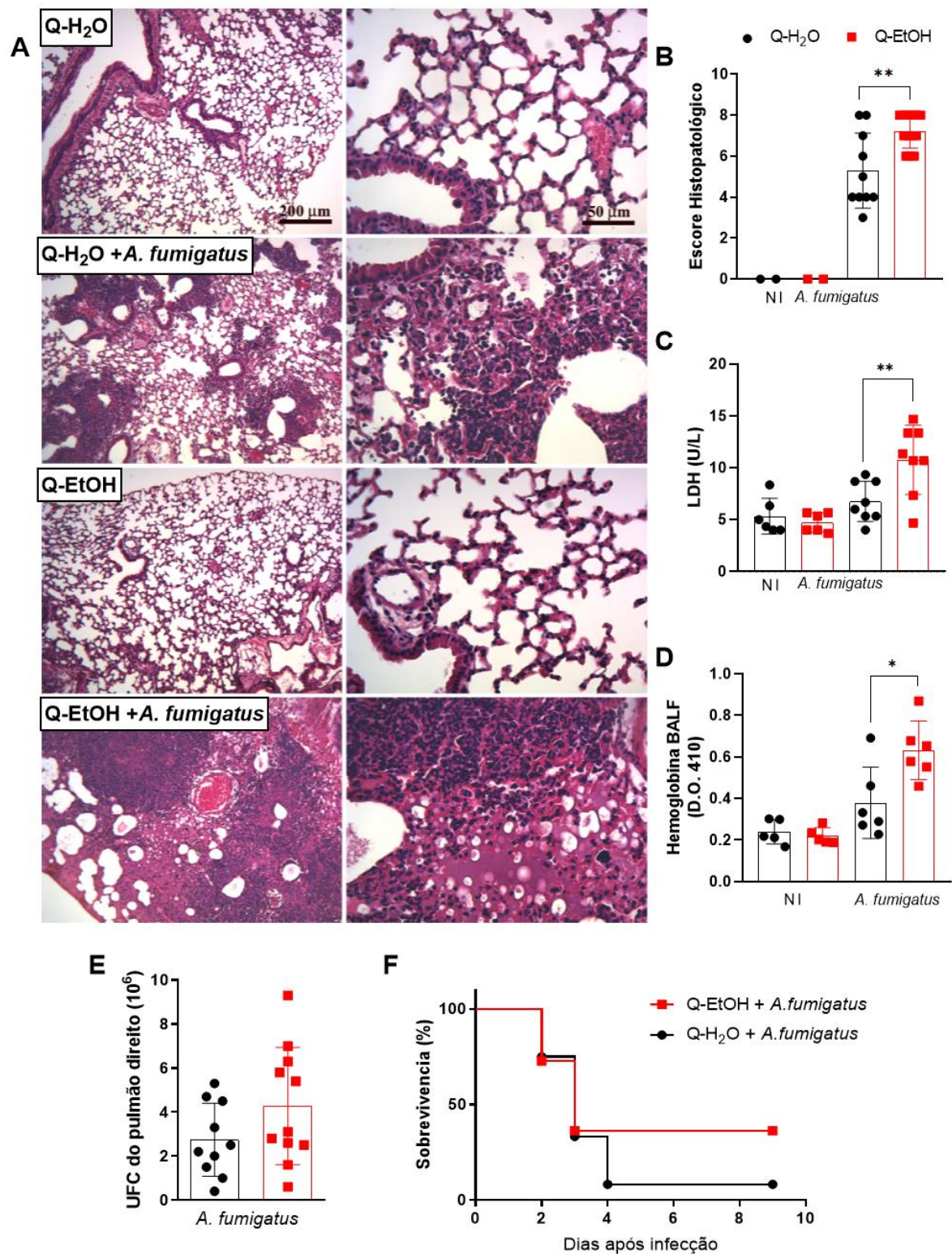
O etanol, e seu metabolismo nas células, é capaz de modular a resposta inflamatória do hospedeiro durante o processo infeccioso a depender da quantidade e frequência da exposição (Kany et al., 2019). O consumo crônico de etanol é fator de risco para o desenvolvimento de pneumonias justamente por alterar os mecanismos responsáveis pelo controle do patógeno e retorno à homeostase tecidual. Para investigar os efeitos persistentes do consumo de etanol na medula óssea e as consequências para a resposta inflamatória frente ao patógeno fúngico, transplantamos animais não tratados com a MO de animais controle ou cronicamente expostos ao etanol. Após a quimerização, os animais foram infectados e os parâmetros fisiopatológicos, após dois dias de infecção, foram observados.

Na coloração de HE dos pulmões, podemos observar que os animais não infectados de ambos os grupos quimerizados apresentam morfologia pulmonar intacta, com espaços

alveolares livres e pouco ou nenhum, infiltrado inflamatório (Figura 5.A). Em contraste, observamos que ambos os grupos infectados apresentam acúmulos de células inflamatórias, edema e focos de necrose (Figura 5.A). Este perfil se encontra ressaltado nos grupos de animais quimera EtOH, que apresentam grau aumentado de necrose e focos de hemorragia (Figura 5.A). O escore histopatológico dos pulmões demonstra que a lesão pulmonar causada pela infecção fúngica é agravada nos animais quimera EtOH (Figura 5.B). O perfil histopatológico encontrado também foi corroborado pelas análises de morte celular e presença de hemoglobina no BALF. Os dados demonstram que os animais quimera etanol infectados apresentam um aumento da quantidade de LDH e hemoglobina no lavado, que estão associados a um aumento da lesão e hemorragia pulmonar durante infecção por *A. fumigatus* (Figura 5.C e D) (Tischler et al., 2020).

As lesões pulmonares observadas na aspergilose pulmonar invasiva são caracterizadas pelo proeminente infiltrado pulmonar de granulócitos e pequenos focos de necrose coagulativa, fenótipo que é observado nos animais quimera H<sub>2</sub>O após a infecção (Shibuya et al., 1997). Porém, este fenótipo encontra-se agravado nos animais quimera EtOH infectados, que apresentam áreas de necrose liquefativa, onde a estrutura do tecido é perdida, níveis aumentados de LDH e hemorragia no lavado, demonstrando que a resposta inflamatória gerada pelas células produzidas na medula óssea exposta ao etanol agrava as lesões pulmonares durante a infecção por *A. fumigatus*.

Apesar disso, a carga fúngica pulmonar e a sobrevivência dos animais infectados não diferiu entre os grupos de animais quimerizados (Figura 5.E e F). Isto pode ressaltar a importância de outros mecanismos de defesa no combate ao *A. fumigatus*, como o aparelho mucociliar e a produção de peptídeos antimicrobianos pelas células epiteliais, que não foram expostos ao etanol nos animais receptores (Margalit & Kavanagh, 2015; Walsh et al., 2005). A estrutura da interação entre microrganismo e hospedeiro é alterada em tecidos lesados, que podem ter origem tanto da resposta imunológica quanto da resposta patológica (Pirofski & Casadevall, 2008). Ademais, os dados explicitam a necessidade da investigação dos mecanismos celulares alterados pelo consumo do etanol que permitem o combate ao fungo em condições teciduais adversas.



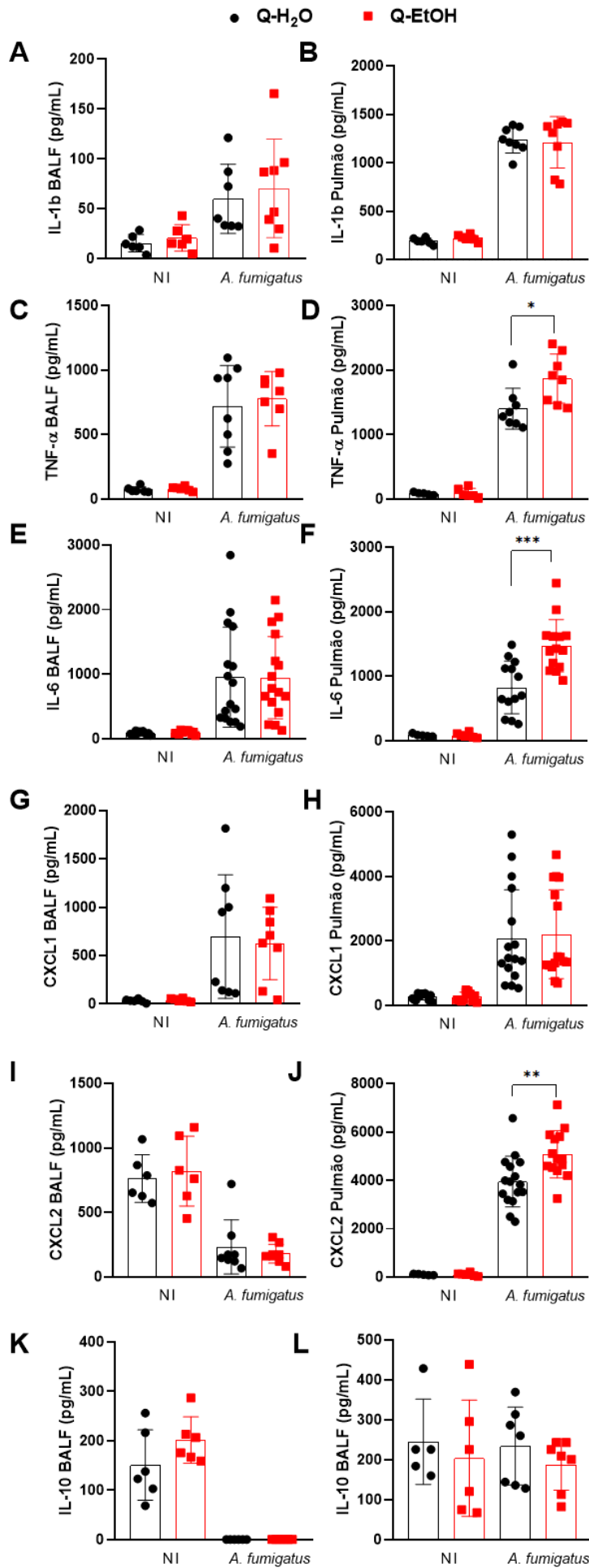
**Figura 5. Análises histopatológicas pulmonares de animais quimeras após 48 horas de infecção.** Camundongos quimeras receptores de medula óssea de animais controle e tratados com etanol foram inoculados com  $10^8$  conídios de *A. fumigatus*. Após 48h de infecção, o BALF e pulmões foram coletados. (A) Micrografias de pulmão corados em HE, (B) Quantificação do

escore histopatológico das lâminas de pulmão, (C) LDH do BALF, (D) Densidade óptica BALF no comprimento de onda de hemoglobina, (E) UFC do pulmão e (F) Curvas de sobrevivência dos animais infectados. \*Diferença significativa ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,05$ ).

***A inflamação tecidual dos animais quimera EtOH infectados é maior quando comparada aos animais quimera H<sub>2</sub>O infectados***

O processo de inflamação pulmonar gerado pela exposição aos patógenos é essencial para o recrutamento e ativação das células do sistema imunológico, que serão responsáveis por garantir a depuração fúngica e o retorno à homeostase tecidual (Dagenais & Keller, 2009). O aumento da lesão pulmonar nos levou a investigar o *status* inflamatório nos alvéolos e no parênquima pulmonar dos animais quimerizados. Os níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6, das quimiocinas ligantes de CXCR2, CXCL1 e CXCL2 e da citocina anti-inflamatória IL-10, foram avaliados no sobrenadante do lavado e no macerado do pulmão.

Podemos observar um aumento da produção de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e CXCL1, e uma diminuição na produção de IL-10, nos alvéolos dos animais infectados após dois dias de infecção, mas que não diferiu entre os grupos quimerizados (Figura 6. A, C, E, G e K). No parênquima pulmonar, também observamos um aumento dessas citocinas nos grupos infectados, porém, podemos destacar um aumento dos níveis de IL-6, TNF- $\alpha$  e CXCL2 dos animais quimera etanol (Figura 6. D, F e J). Essa produção diferencial não foi observada nos animais não infectados, demonstrando que a resposta alterada é acionada e expressa após o estímulo infeccioso.



**Figura 6. Produção de mediadores inflamatórios após 48 horas de infecção nos animais quimera.** Camundongos quimera receptores de medula óssea de animais controle e tratados com etanol foram inoculados com  $10^8$  conídios de *A. fumigatus*. Após 48h de infecção, o BALF e pulmões foram coletados. (A) IL-1 $\beta$  no BALF, (B) IL-1 $\beta$  no pulmão, (C) TNF- $\alpha$  no BALF, (D) TNF- $\alpha$  no pulmão, (E) IL-6 no BALF, (F) IL-6 no pulmão, (G) CXCL-1 no BALF, (H) CXCL-1 no pulmão, (I) CXCL2 no BALF, (J) CXCL2 no pulmão, (K) IL-10 no BALF e (L) IL-10 no pulmão. \*Diferença significativa ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,05$ ), \*\*\* ( $p < 0,001$ ).

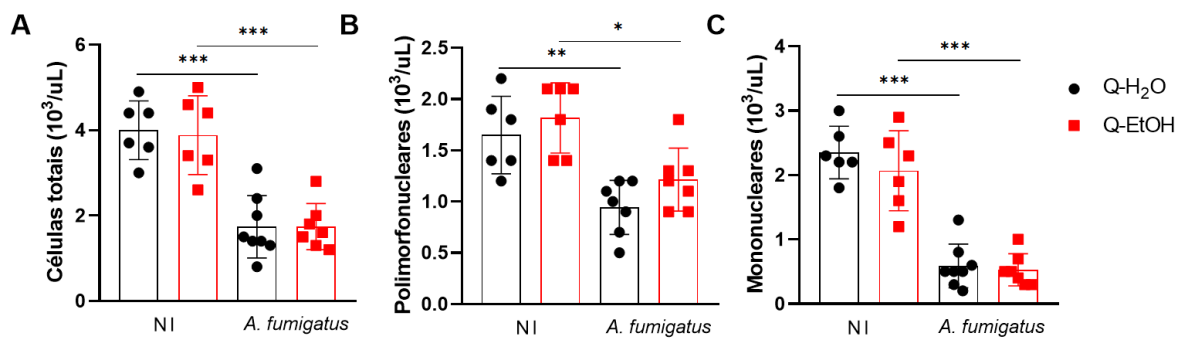
A alteração na produção de citocinas e quimiocinas após a exposição ao etanol parece ter efeitos opostos, e dependem em grande parte da quantidade e da constância do consumo, estando o aumento relacionado ao consumo crônico e a inibição relacionada ao consumo agudo (Kany et al., 2019). Kendrick e colaboradores demonstraram que o consumo crônico do álcool aumenta o padrão de acetilação no promotor do gene de IL-6 nas células de *Kupffer*, macrófagos residentes do fígado, o que leva a um aumento da expressão do gene e dos níveis proteicos neste órgão (Kendrick, 2010).

Apesar da discussão do efeito da exposição ao etanol na produção de citocinas e quimiocinas girar em torno do efeito transitório entre o consumo agudo e o consumo crônico, nossos dados demonstram que as modificações podem se manter nas células imunes após a interrupção do consumo do etanol e após vários ciclos hematopoiéticos na medula óssea. De maneira semelhante, em 2019, Johnstone e colaboradores comprovaram que o aumento na produção de IL-6 era mantido também na micróglia, macrófagos residentes cerebrais, após 21 dias de interrupção da exposição crônica ao etanol (Johnstone et al., 2019). Esses dados sugerem que o consumo crônico de etanol altera a regulação da expressão de citocinas e quimiocinas inflamatórias mesmo após a interrupção da exposição, o que pode indicar a alteração nos mecanismos de regulação epigenéticos destes genes.

#### ***A exposição ao etanol não altera a produção celular pela medula óssea nos animais quimerizados***

Para avaliar se o consumo de álcool pelos animais doadores afetava a produção de leucócitos nos animais receptores após a recuperação do transplante, foi realizado um

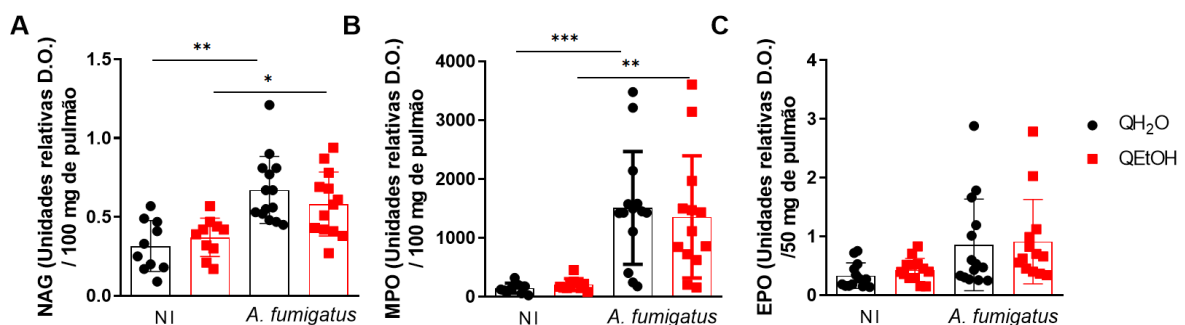
leucograma dos animais quimerizados. Não foram observadas diferenças na produção de células totais, mononucleares e polimorfonucleares no sangue dos animais quimera EtOH e quimera H<sub>2</sub>O (Figura 7. A-C). Os efeitos do consumo do etanol na hematopoiese também diferenciam o consumo crônico e agudo de etanol. RAASCH e colaboradores, em 2010, mostraram que o consumo agudo de etanol induz a diminuição da quantidade circulante de granulócitos em camundongos após infecção por *S. pneumoniae*. Eles demonstram que essa diminuição ocorre devido a diminuição da proliferação da linhagem granulocítica pela medula óssea após o estímulo. Porém, animais que consomem álcool cronicamente não demonstram diferença na quantidade de leucócitos totais no sangue e nem na produção de granulócitos pela MO antes e durante a infecção por *A. fumigatus* (Malacco et al., 2020). Diante disto, pode-se sugerir que a diminuição de polimorfonucleares no sangue durante o estímulo por *S. pneumoniae* deve estar relacionada com os efeitos do consumo agudo de etanol, e que a produção de leucócitos pela MO é normalizada durante a adaptação do organismo ao consumo crônico da substância.



**Figura 7. Leucograma dos animais quimera.** Camundongos quimera receptores de medula óssea de animais controle e tratados com etanol foram inoculados com 10<sup>8</sup> conídios de *A. fumigatus*. Após 48h de infecção, o sangue foi coletado e a quantidade de leucócitos foi avaliada no hemocitômetro. (A) Células totais no sangue, (B) Células polimorfonucleares no sangue e (C) Células mononucleares no sangue. \*Diferença significativa ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,05$ ), \*\*\* ( $p < 0,001$ ).

Na ausência de diferença nas quantidades de células circulantes nos animais

quimerizados e devido ao aumento da produção de quimiocinas e citocinas no pulmão dos animais quimera EtOH, investigamos se haveria diferenças na migração celular para o tecido pulmonar. O reconhecimento dos PAMPs de *A. fumigatus* pelos PRRs das células epiteliais e residentes do pulmão gera uma resposta pró-inflamatória que leva à quimioatração das células circulantes para o tecido (Margalit & Kavanagh, 2015; Hold et al., 2005; Phadke & Mehrad, 2005). O recrutamento neutrofílico é essencial, visto que a neutropenia é um dos maiores fatores de risco para o desenvolvimento de aspergilose pulmonar invasiva (Latgé & Chamilos, 2019; Bonnett et al., 2006). Podemos observar que 48 horas após a infecção, ambos os grupos de animais quimerizados apresentam um influxo neutrofílico para o pulmão, porém, que não difere entre os grupos quimera EtOH e quimera H<sub>2</sub>O (Figura 8.A). Não foram observadas diferenças nas quantidades de eosinófilos e macrófagos no pulmão de nenhum dos grupos experimentais (Figura 8.B e C). O aumento da produção de quimiocinas observado no pulmão dos camundongos quimera etanol não refletiu um aumento da migração celular após o estímulo, o que pode estar associado com a mesma capacidade de depuração fúngica observada em ambos os grupos de animais quimerizados. Ademais, podemos observar que mesmo com quantidades similares de células, o grupo quimera etanol apresenta um aumento da produção dos mediadores pró-inflamatórios que pode estar relacionado com as alterações causadas pelo consumo crônico do álcool no controle da expressão gênica relacionados a sinalização celular após o estímulo.

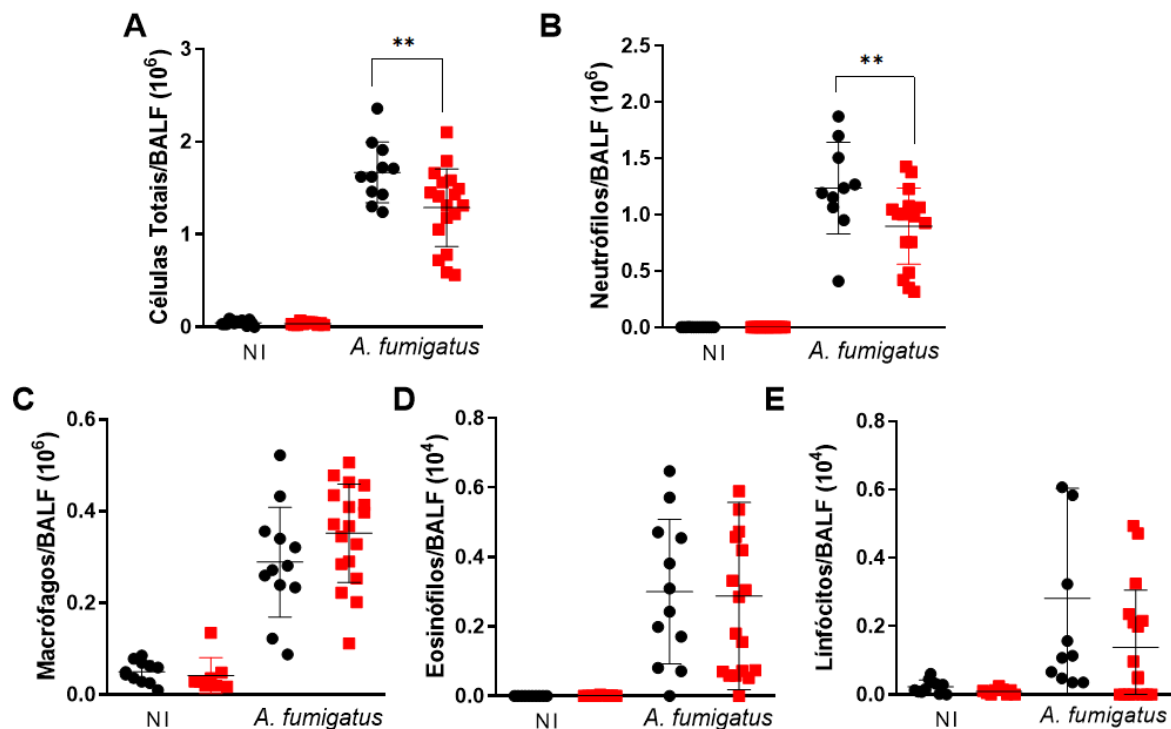


**Figura 8. Infiltrado celular pulmonar dos animais quimerizados.** Camundongos quimera receptores de medula óssea de animais controle e tratados com etanol foram inoculados com  $10^8$  conídios de *A. fumigatus*. Após 48h de infecção, os pulmões foram coletados para mensuração de (A) NAG, neutrófilos (B) MPO e Eosinófilos (C) EPO dos pulmões. \*\*Diferença significativa ( $p < 0,01$ ), \*\*\*( $p < 0,001$ ).



*Os neutrófilos dos animais quimera EtOH apresentam prejuízo na migração, depuração fúngica e fagocitose de conídios de A. fumigatus*

Após a inalação, os conídios inicialmente encontram a mucosa das vias aéreas e o epitélio alveolar, dando início à resposta pró-inflamatória no sítio infeccioso e o recrutamento celular necessário para o combate ao fungo (Dagenais & Keller, 2009). Para avaliar a migração celular para os alvéolos, realizamos a coleta das células presentes nos alvéolos através do lavado broncoalveolar (BAL). Em camundongos imunocompetentes, a migração celular se evidencia 24 horas após a infecção por *A. fumigatus* e tem seu pico alcançado 72 horas após a infecção (Malacco et al., 2019). Podemos observar, após 48 horas de infecção, um aumento da migração de células para os alvéolos de ambos os grupos de animais quimerizados, porém, que é significativamente menor nos alvéolos dos animais quimera EtOH (Figura 9.A). Após a contagem diferencial das células, não observamos diferença entre os grupos de animais quimerizados infectados na migração de macrófagos, eosinófilos e linfócitos para os alvéolos (Figura 9.C-E). Entretanto, observa-se um perfil de migração neutrofílica diminuído nos grupos quimera etanol infectados (Figura 9.B).

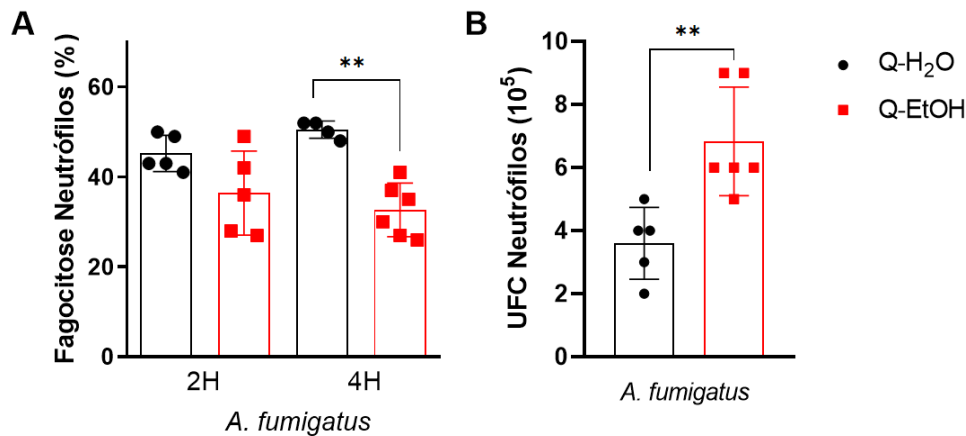


**Figura 9. Infiltrado celular nos alvéolos dos animais quimerizados. Camundongos**

quimera receptores de medula óssea de animais controle e tratados com etanol foram inoculados com  $10^8$  conídios de *A. fumigatus*. Após 48h de infecção, o BALF foi coletado. (A) Células totais no BALF, (B) Neutrófilos, (C) Macrófagos, (D) Eosinófilos e (E) Linfócitos. \*\*Diferença significativa ( $p < 0,01$ ).

Nosso grupo de pesquisa, em artigo publicado em 2020, demonstrou que animais expostos cronicamente ao etanol, apesar de apresentarem aumento na produção de CXCL2 e níveis similares de CXCL1 no BALF, após infecção por *A. fumigatus*, apresentam uma menor migração de neutrófilos para os alvéolos e para o parênquima pulmonar (Malacco et al., 2020). Demonstramos ainda, que essas células apresentavam uma diminuição do receptor CXCR2 e CD11b, essenciais para garantir a transmigração de neutrófilos do sangue para os órgãos durante o processo de inflamação aguda (Kolaczkowska & Kubes, 2013; Malacco et al., 2020). Com esses resultados podemos observar que os efeitos inibitórios na migração neutrofílica persistem nas células produzidas pela MO exposta ao etanol e podem indicar um futuro mecanismo de manejo de pacientes que apresentam histórico de abuso de álcool durante infecções fúngicas.

Para avaliar a função dos neutrófilos dos animais quimerizados, incubamos neutrófilos *ex vivo* com os conídios de *A. fumigatus*. O índice fagocítico de ambos os grupos experimentais foi similar nas primeiras duas horas de exposição ao fungo, porém, após 4 horas de infecção, observamos que os neutrófilos dos animais quimera EtOH apresentavam uma menor capacidade fagocítica, e após 6 horas, também apresentavam uma menor capacidade depurativa (Figura 10. A e B). Esses dados corroboram os efeitos persistentes do consumo crônico do etanol da função celular e explicitam a importância da investigação dos mecanismos celulares de manutenção das alterações observadas nestas células. O prejuízo na atividade dos neutrófilos não se restringe ao processo de migração. Neutrófilos de animais expostos ao etanol também apresentam menor capacidade fagocítica, de depuração fúngica e produção de ROS após estímulo com *A. fumigatus* (Malacco et al., 2020).

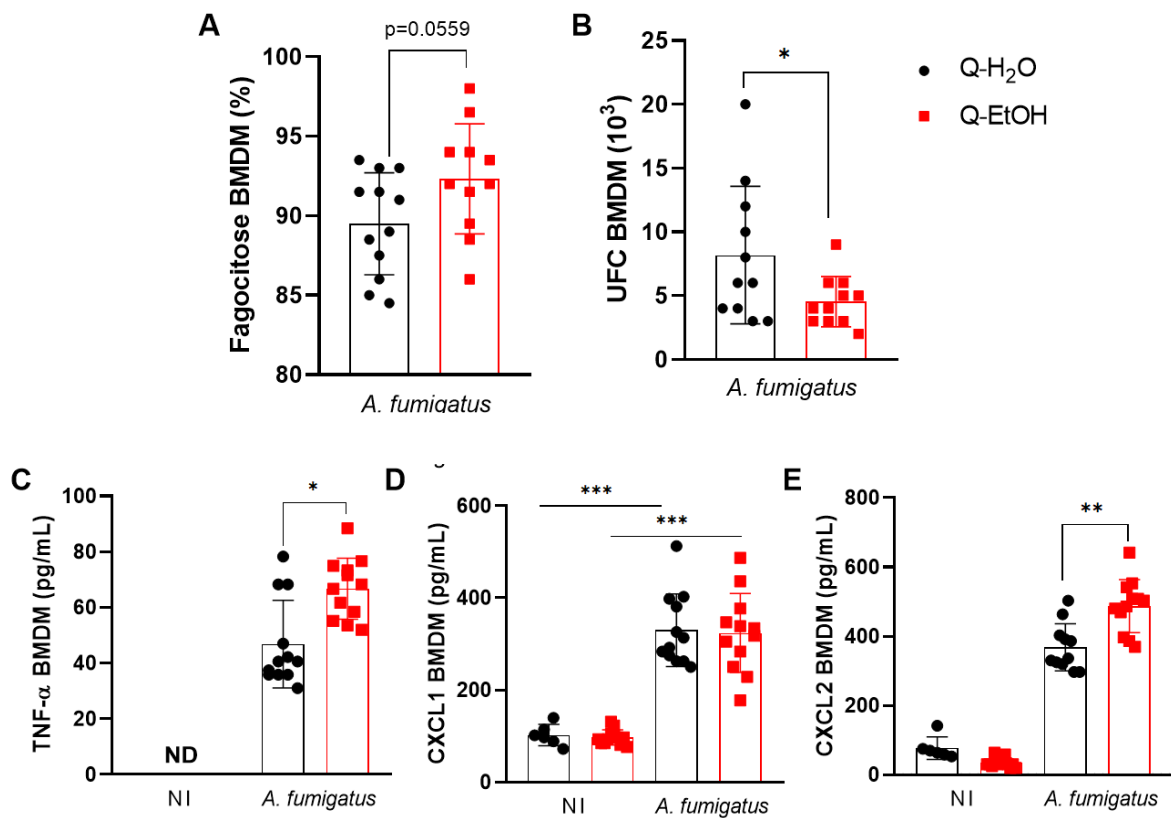


**Figura 10. Fagocitose e *killing* de neutrófilos *ex vivo* estimulados com *A. fumigatus*.**

Neutrófilos provenientes da MO dos camundongos quimera receptores de medula óssea de animais controle e tratados com etanol foram incubados com conídios de *A. fumigatus*. (A) Fagocitose após 2h e 4h de exposição aos conídios e (B) Unidades formadoras de colônia remanescentes após 6 horas de infecção. \*Diferença significativa ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,05$ ).

***Macrófagos dos animais quimera EtOH apresentam aumento da depuração fúngica e da produção de mediadores inflamatórios***

Curiosamente, a diminuição da função efetora dos neutrófilos não reflete a carga fúngica encontrada no pulmão dos camundongos quimera etanol, o que nos levou a investigar a importância da ação efetora de outro fagócito profissional, o macrófago. Após a irradiação que antecede o transplante, a população de macrófagos alveolares que coloniza o pulmão e tem origem no saco vitelino durante o desenvolvimento embrionário, é depletada e substituída, em parte, por macrófagos originados da medula óssea (Martin et al., 2021). Ao diferenciar BMDMs de animais quimera e estimulá-los com conídios de *A. fumigatus*, observamos que as células do grupo quimera etanol, apesar de não apresentar diferenças estatísticas quanto à fagocitose, apresentavam uma maior capacidade depurativa quando comparadas às células dos animais quimera H<sub>2</sub>O (Figura 11. A e B). Essa maior atividade dos BMDMs dos animais quimera EtOH também refletiu no aumento na produção de TNF- $\alpha$  e CXCL2 após 4 horas de exposição ao fungo (Figura 11. C e E). As citocinas IL-6 e IL-10 não foram detectadas no sobrenadante da cultura celular de nenhum dos grupos analisados.



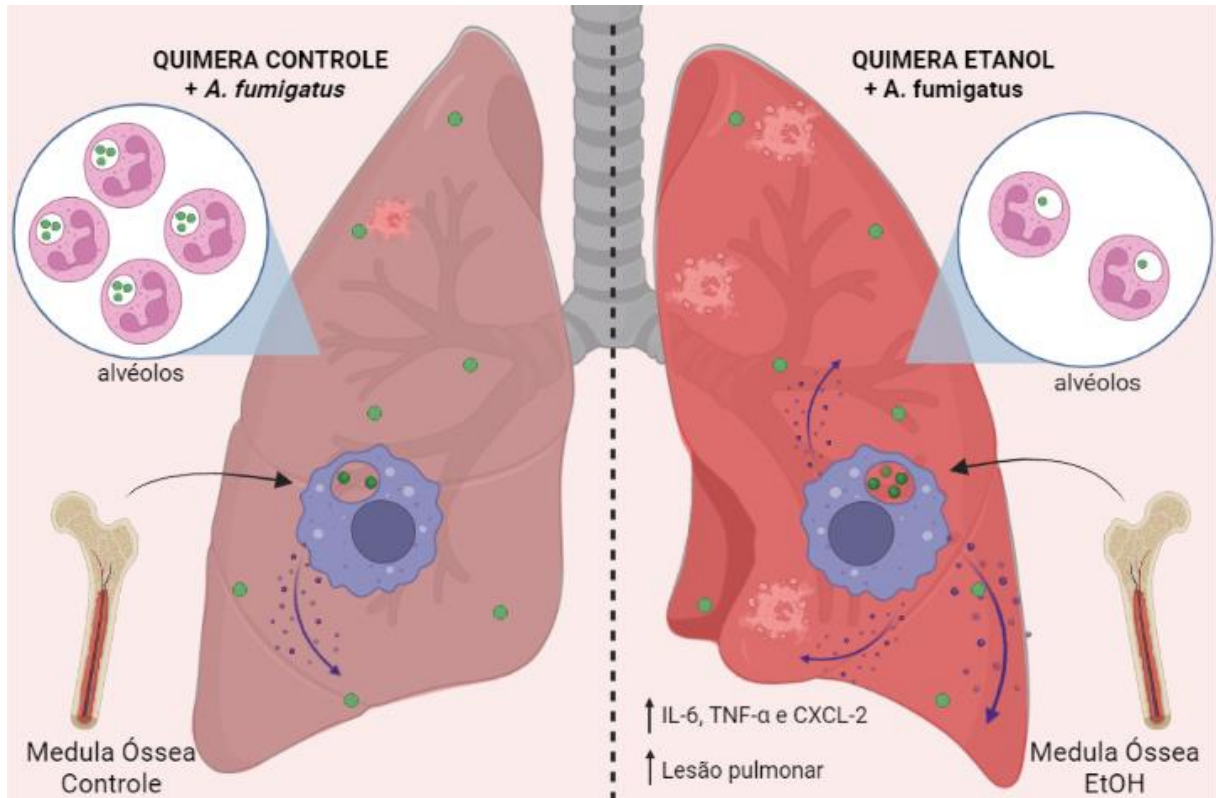
**Figura 11. Fagocitose, *killing* e produção de citocinas de BMDMs estimulados com *A. fumigatus*.** BMDMs provenientes da MO dos camundongos quimera receptores de medula óssea de animais controle e tratados com etanol foram incubados com conídios de *A. fumigatus*. (A) Índice fagocítico após 4 horas de exposição aos conídios. (B) Unidades formadoras de colônia remanescentes após 6 horas de infecção. Dosagem dos mediadores inflamatórios (C) TNF- $\alpha$ , (C) CXCL1 e (D) CXCL2 por Elisa. \*Diferença significativa ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,05$ ), \*\*\* ( $p < 0,001$ ).

A hiperresponsividade de macrófagos alveolares ao estímulo com LPS, e a indução da produção aumentada de mediadores inflamatórios, foi observada por Lewis e colaboradores em células provenientes de macacos Rhesus que consumiram álcool cronicamente (Lewis et al., 2022). Eles associaram este fenótipo ao aumento da acessibilidade da cromatina nas regiões reguladoras dos genes inflamatórios aos seus correspondentes fatores de transcrição. Este e outros trabalhos discutem o efeito da exposição prolongada ao etanol com a regulação do estado da cromatina através de modificações epigenéticas, que, apesar de não alterarem a sequência nucleotídica no DNA, são herdáveis e têm papel fundamental na regulação da expressão gênica

(Malherbe & Messaoudi, 2022). Nossos dados demonstram que o aumento da produção de mediadores inflamatórios após estímulo com *A. fumigatus* é persistente nas células produzidas pela MO exposta ao etanol, o que pode indicar alterações no controle epigenético destes genes. Ademais, outros experimentos precisam ser realizados para comprovar nossas hipóteses.

O aumento da produção destes mediadores pró-inflamatórios pelos macrófagos infectados dos animais quimera etanol está associado ao aumento do status inflamatório que observamos nos pulmões dos animais quimera etanol infectados, e refletem o aumento da lesão pulmonar e da morte celular encontrada no tecido destes animais (Figura 5). Além disso, o aumento da atividade depurativa dos macrófagos pode contrabalancear o efeito supressor encontrado nos neutrófilos e permitir o combate ao fungo durante a infecção. Assim como na atividade efetora dos neutrófilos, os efeitos do consumo crônico do álcool parecem persistir nos macrófagos mesmo na ausência do etanol e após vários ciclos hematopoiéticos na medula óssea, e refletem uma resposta imune desregulada durante a infecção fúngica.

Nesta etapa do trabalho, pudemos demonstrar que as alterações causadas pelo consumo crônico do etanol nas células hematopoiéticas persistem após o transplante de medula e a maturação de novas células imunes. Essas alterações refletem um prejuízo nas funções celulares efetoras, como fagocitose, depuração fúngica e produção de mediadores inflamatórios, de neutrófilos e macrófagos, durante a infecção por *A. fumigatus* (Figura 12). Esses dados nos fornecem evidências de efeitos duradouros do consumo crônico de etanol na medula óssea, e podem nos ajudar no estudo da patofisiologia das doenças infecciosas dentro da população de alcoolistas, o que é essencial para a busca de terapias que possam minimizar a morbidade e mortalidade destas pessoas.



**Figura 12. Caracterização dos efeitos persistentes do consumo crônico de etanol na medula óssea.** Nos animais quimerizados controle, após infecção por *A. fumigatus*, os macrófagos alveolares reconstituídos pela MO irão fagocitar os conídios e iniciar a resposta pró-inflamatória, recrutando neutrófilos que apresentam alta capacidade depurativa (esquema à esquerda). Por outro lado, os animais quimerizados etanol, após infecção por *A. fumigatus*, apresentam um aumento da produção de mediadores inflamatórios pelos macrófagos, o que reflete em um aumento de lesão e inflamação pulmonar, um menor infiltrado alveolar neutrofílico, que apresenta menor capacidade fagocítica e depurativa (esquema à direita).

## CAPÍTULO II - Efeitos da exposição aguda ao etanol na resposta inflamatória gerada pela infecção por *A. fumigatus*

### OBJETIVO

Investigar, *in vitro*, os efeitos da exposição ao etanol na resposta inflamatória de macrófagos frente infecção por *Aspergillus fumigatus*.

#### Objetivos específicos

- Avaliar a toxicidade da exposição ao etanol em macrófagos *in vitro*.
- Avaliar a fagocitose, depuração fúngica e produção de mediadores inflamatórios de macrófagos expostos ao etanol e infectados com *A. fumigatus*.
- Investigar as alterações na glicólise gerada pela exposição ao etanol.

### METODOLOGIA

#### Cultura celular

Foi utilizada a linhagem imortalizada de macrófago RAW 264.7 (ATCC). As células foram cultivadas em meio *Dulbecco 's Modified Eagle* (DMEM) (CultiLab) e mantidas em estufa a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>, com suplementação de 10% de soro fetal bovino (SFB). Para os experimentos, as células foram semeadas na concentração de 5x10<sup>4</sup> células por poço em 500 µL nas placas de 24 poços e incubadas na estufa, pelo menos 12 horas antes dos experimentos, para garantir a aderência das células nas lamínulas presentes no fundo de cada um dos poços. Para o tratamento com etanol, o meio foi retirado e substituído por meios contendo 7 diferentes concentrações de etanol: 5 mM, 10 mM, 25 mM, 50 mM, 75 mM, 100 mM e 250 mM. Os meios contendo etanol foram substituídos a cada 24 horas, por 2 dias.

#### Toxicidade e viabilidade celular

Para determinar a viabilidade celular após a exposição ao álcool, as células foram incubadas com brometo de 3- [4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,5-difeniltetrazólio (MTT) por 2 horas. A absorbância do corante foi medida em um comprimento de onda de 570 nm. Para a determinação da toxicidade da exposição ao álcool, foi utilizado o *kit* de método enzimático cinético de Desidrogenase Láctica (LDH) (Bioclin), com avaliação da e a densidade óptica

(D.O.) em espectrofotômetro a 340 nm.

Para determinar a viabilidade celular após a exposição ao 2-Deoxi-D-glicose (2-DG),  $5 \times 10^4$  células foram plaqueadas por poço em placas de 24 poços, pelo menos, 12 horas antes do experimento. As células foram expostas por 1, 2 e 3 horas com concentrações de 3, 10 e 30 mM de 2DG. Após as respectivas incubações foi realizado o teste de MTT.

Em ambos os experimentos, água de injeção foi utilizada como controle positivo de dano às células por, através de choque osmótico, levar ao rompimento da membrana plasmática. Para o controle negativo foi utilizado DMEM suplementado com 2,5% de SFB.

### **Fagocitose e depuração fúngica**

Os conídios da linhagem A1163 de *A. fumigatus* foram estriados em placas de 20 mL de meio completo sólido YAG (2% p/v de glicose, 2% p/v de ágar, 0.5% p/v de extrato de levedura e elementos traço) e incubados por 48 horas a 37°C (Soriani et al, 2008). Os conídios foram ressuspensos em solução de PBS 1X estéril e separados do micélio através de filtração em gases estéreis. A solução contendo os conídios foi centrifugada a 652 RCF, por 10 minutos, em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspense em 1 mL de PBS 1X estéril. Foram realizadas diluições seriadas (1:10.000) para a contagem dos conídios na câmara de Neubauer e o inóculo foi preparado em solução de PBS 1X estéril.

Ao final do tratamento com etanol, o sobrenadante das células foi removido e substituído por meio DMEM 2,5% de SFB contendo  $2,5 \times 10^5$  conídios de *A. fumigatus*. Os poços controle foram incubados apenas com meio DMEM 2,5% de SFB. Para a análise da fagocitose, as células foram incubadas em estufa a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> durante 4 horas. O sobrenadante da cultura foi coletado e armazenado em -20°C para futuras análises. As células foram lavadas com PBS 1X a 37°C e as lamínulas foram coradas com Kit panótico rápido (Laborclin) seguindo protocolo descrito pelo fabricante. O índice fagocítico foi avaliado em microscópio óptico, pela determinação das células que continham pelo menos um conídio em seu citoplasma em relação ao total de células. A quantidade de conídios fagocitados por célula foi realizada através da contagem diferencial exclusivamente das células contendo pelo menos um conídio em seu citoplasma.

Para a análise da carga fúngica, as células foram incubadas em estufa a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> durante 6 horas. O sobrenadante foi removido, as células foram lavadas com PBS 1X estéril a 37°C e lisadas com água de injeção gelada. O lisado foi coletado, diluído (1:100) e 100 µL da solução foi semeada em placas contendo 15 mL meio completo sólido YAG. As placas foram



incubadas por 18 horas a 37°C e as unidades formadoras de colônia (UFC) foram contadas a partir do crescimento individual das colônias.

### **Captação de glicose e produção de lactato**

Para a dosagem de glicose e lactato, foi coletado o sobrenadante das células após o tratamento com etanol e incubação com o fungo. A determinação de ambas moléculas foi realizada através de *kits* colorimétricos da marca específicos (Bioclin), seguindo os protocolos estabelecidos pelo fabricante.

### **ELISA**

A avaliação dos níveis de citocinas e quimiocinas foi realizado do sobrenadante da cultura celular pelo método imunoenzimático de ELISA sanduíche utilizando anticorpos murinos específicos para as citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10, e para as quimiocinas CXCL1 e CXCL2. O ensaio foi realizado de acordo com as especificações do fabricante (R&D Systems). O produto das marcações foi avaliado em espectrofotômetro a 492 nm e a concentração calculada a partir da densidade óptica (D.O.) da curva padrão e das amostras.

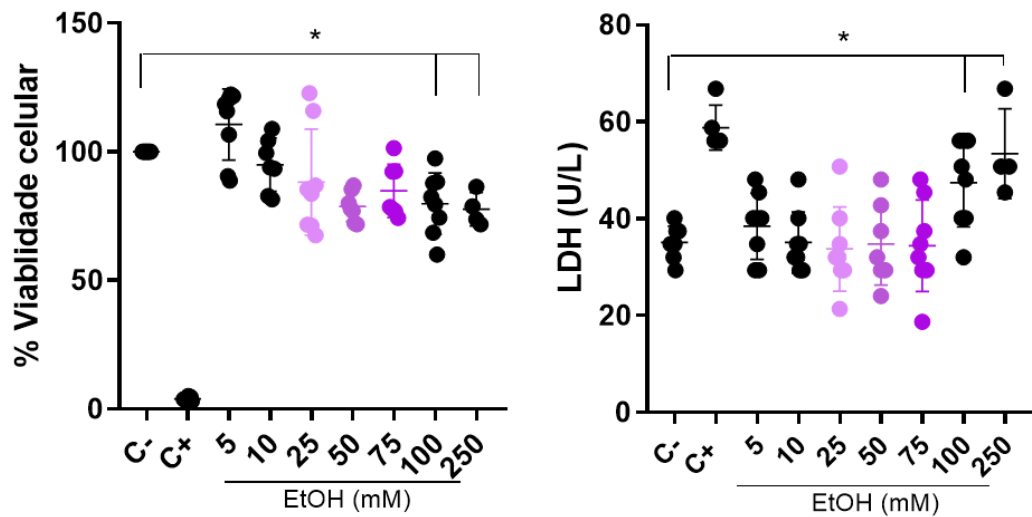
### **Análises estatísticas**

A construção de gráficos e análises estatísticas dos dados obtidos foram realizadas através do software GraphPad Prism versão 8.0. As análises entre as diferenças de mais de dois grupos foram determinadas pela análise de variância de uma via (One Way – ANOVA) seguidas pelo pós- teste de Tukey. As análises de diferenças entre dois grupos foram analisadas por teste *t student*. Os dados foram considerados estatisticamente diferentes se  $p < 0,05$ .

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### ***A exposição ao etanol inibe a fagocitose e a depuração de conídios de A. fumigatus***

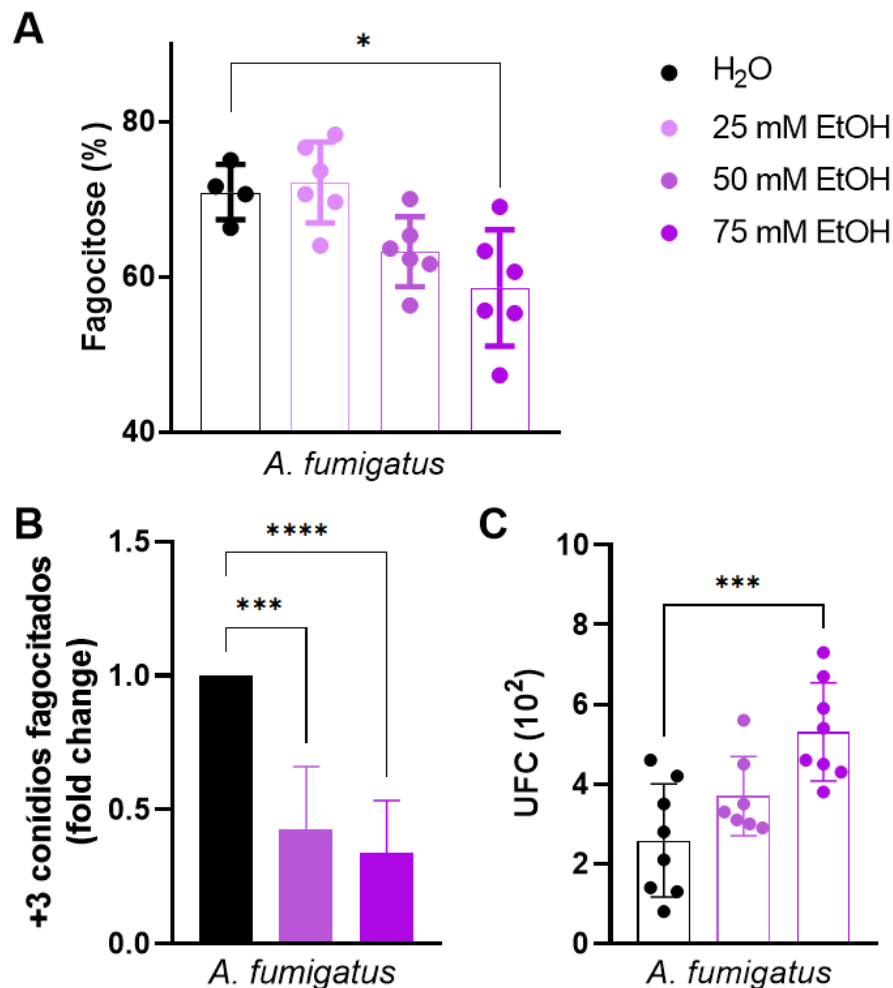
Para avaliar o efeito do etanol na função celular dos macrófagos, se fez necessária a padronização da concentração celular e alcoólica para o cultivo. Inicialmente foram realizados testes da exposição de  $5 \times 10^5$  células a 5, 10, 25, 50, 75, 100 e 250 mM de etanol, porém, nenhuma das concentrações afetou a viabilidade celular (Dados não mostrados). Os próximos experimentos foram realizados utilizando  $5 \times 10^4$  células e as mesmas concentrações de etanol. Os dados demonstraram que, após as 48 horas de exposição, a viabilidade celular diminui nas concentrações de 100 mM e 250 mM de etanol, em conjunto com o aumento no dano celular observado pelo aumento da presença de LDH no sobrenadante (Figura 13).



**Figura 13. Avaliação da toxicidade celular causada pela exposição ao etanol.** Macrófagos da linhagem RAW 264.7 ( $5 \times 10^4$  células) foram incubadas com 5, 10, 25, 50, 75, 100 e 250 mM de etanol por 48 horas para a mensuração da (A) viabilidade celular (MTT) e a (B) quantidade de LDH presente no sobrenadante das células. \*Diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Para os próximos experimentos foram utilizadas as concentrações de etanol não citotóxicas para  $5 \times 10^4$  células. Após as 48 horas de tratamento com etanol as células foram incubadas com  $2,5 \times 10^5$  conídios de *A. fumigatus*, para avaliação da capacidade fagocítica das células. Podemos observar que os macrófagos expostos a 75 mM de etanol apresentam uma diminuição do índice fagocítico quando comparados às células do grupo controle (Figura 14.A). Além de apresentarem menor índice de células contendo pelo menos um conídio em seu citoplasma, apresentam também uma redução de aproximadamente 50% nas células capazes de fagocitar mais que três conídios (Figura 14.B). O consumo do etanol parece afetar diversos mecanismos que inibem a fagocitose dos macrófagos, como alterações no metabolismo energético e a redução da polimerização da actina, processos críticos para a plasticidade estrutural e metabólica dos macrófagos (Karavitis & Kovacs, 2011; Morris et al., 2022). Em 2020, Malacco e colaboradores demonstraram que a capacidade fagocítica de conídios de *A. fumigatus* por neutrófilos *ex vivo* é diminuída após o consumo crônico de etanol (Malacco et al., 2020). Nossos dados demonstram que a pré-exposição ao etanol também é capaz de reduzir a fagocitose dos conídios de *A. fumigatus* por macrófagos imortalizados, mesmo em concentrações que não afetam a viabilidade das células.

Após a fagocitose, os macrófagos dão início a depuração dos conídios através da produção de espécies reativas de oxigênio e acidificação do fagolisossoma (Dagenais & Keller, 2009; Ibrahim-Granet et al., 2003). No geral, pacientes imunossuprimidos apresentam células imunes com baixa atividade efetora, o que permite o escape dos conídios de dentro dos fagócitos (Dagenais & Keller, 2009). As células expostas a 75 mM de etanol, além de apresentarem diminuição da capacidade fagocítica, também apresentaram diminuição da depuração dos conídios de *A. fumigatus*, observada com o aumento das unidades formadoras de colônia após 6 horas de incubação com as células (UFC) (Figura 14.C). Este perfil de supressão das funções efetoras dos macrófagos expostos ao etanol pode estar relacionado à susceptibilidade de consumistas a infecções pulmonares fúngicas, e pode representar um mecanismo importante para o manejo da aspergilose dentro da população de alcoolistas (Nelson et al. 2008; Malacco et al., 2020).

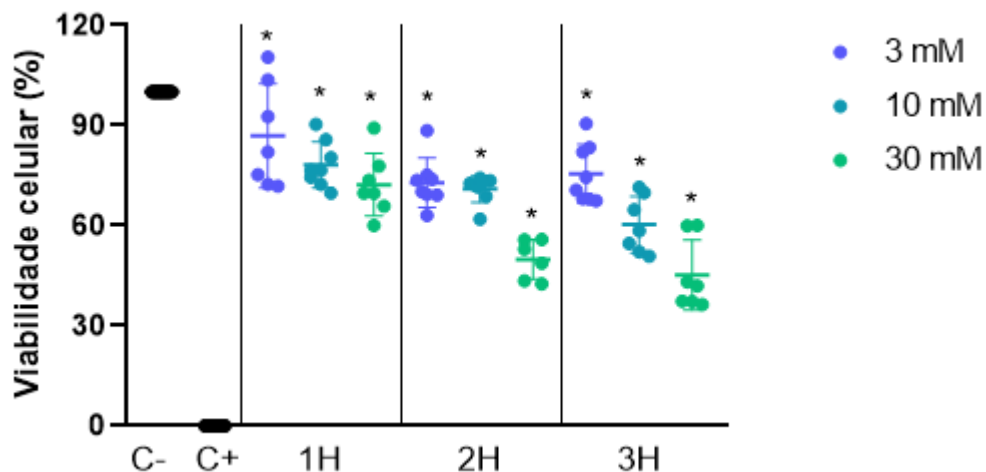


**Figura 14. Avaliação funcional dos macrófagos incubados com etanol.** Macrófagos da linhagem RAW 264.7 ( $5 \times 10^4$  células) foram incubadas com 25, 50 e 75 mM de etanol por 48

horas. Após o tratamento as células foram infectadas com  $2,5 \times 10^5$  conídios de *A. fumigatus* por 4 horas para a quantificação do (A) índice fagocítico e (B) avaliação da quantidade de conídios fagocitados por célula. Para avaliação da (C) carga fúngica, as células foram incubadas com o fungo por 6 horas. \*Diferença significativa ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,05$ ), \*\*\* ( $p < 0,001$ ), \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ).

### ***A exposição ao etanol altera o metabolismo glicolítico nas células***

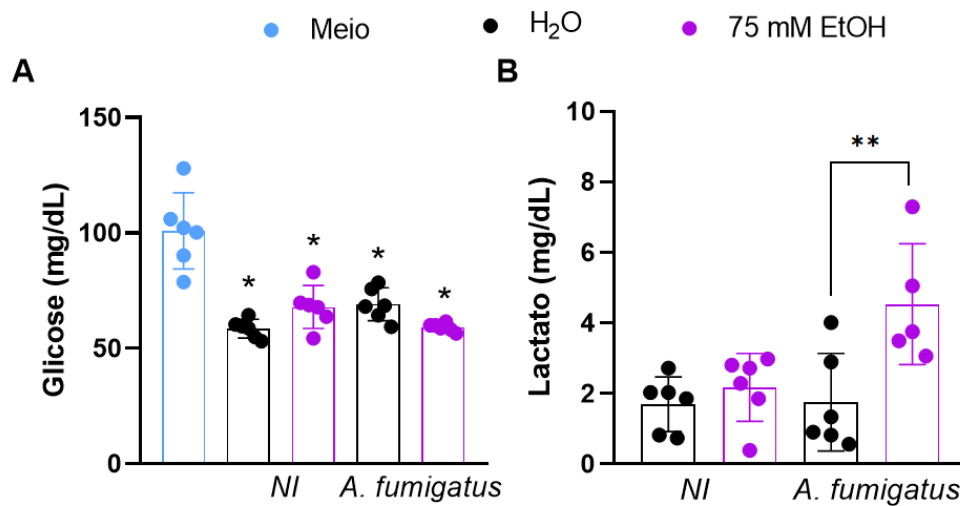
Para avaliar a importância da glicólise no metabolismo energético dos macrófagos após a exposição ao etanol e subsequente fagocitose de conídios de *A. fumigatus*, escolhemos padronizar a utilização do inibidor de glicólise 2-Deoxi-D-glicose (2-DG). Desde os anos 50, o 2-DG é conhecido por atuar na inibição da glicólise, competindo com a glicose durante sua captura e fosforilação, e ao ser fosforilado, acumula no citoplasma das células, diminuindo consideravelmente os passos subsequentes da glicólise (Cramer&Woodward, 1952; Kurtoglu et al., 2007). Em 2014, Venter e colaboradores utilizaram o 2-DG como estratégia para avaliação da importância do metabolismo de carboidratos em macrófagos estimulados com Lipopolissacarídeo (LPS). Eles utilizaram a concentração de 10 mM de 2-DG, e apenas após 15 horas de exposição foi observada diminuição na viabilidade das células (Venter et al., 2014). Essa mesma concentração de 2-DG, após 3 horas de tratamento, foi capaz de inibir a fagocitose de partículas opsonizadas de zimosan (Venter et al., 2014). Porém, observamos que 3, 10 e 30 mM de 2-DG por 1, 2 ou 3 horas reduzem significativamente a viabilidade celular dos macrófagos, o que poderia gerar um viés experimental nas análises de capacidade fagocítica dos macrófagos (Figura 15).



**Figura 15. Avaliação da toxicidade celular causada pela exposição ao 2-DG.** Macrófagos da linhagem RAW 264.7 ( $5 \times 10^4$  células) foram incubadas com 3, 10 e 30 mM de 2-DG por 1, 2 e 3 horas para a mensuração da viabilidade celular (MTT). \*Diferença significativa em relação ao controle negativo ( $p < 0,05$ ).

A quantidade de células por poço pode ser um determinante na toxicidade do 2-DG em cultura celular. Em virtude da ausência da quantidade de células utilizada nos experimentos de Venter e colaboradores, não conseguimos comparar os efeitos observados em nossos dados. Ademais, a utilização de 2-DG vem sendo estudada como potencial agente antitumoral, vista a importância da via glicolítica nas células cancerosas (Zhang et al., 2019). A cultura de imortalizada de RAW 264.7 foi estabelecida em meio com adição de glicose e pode ser mais sensível a alterações causadas no metabolismo da glicolítico, portanto, optamos por outra abordagem de análise da glicólise durante a exposição ao etanol, buscamos avaliar a captura de glicólise e subsequente liberação de lactato (Ganeshan & Chawla, 2014; Raschke et al. 1978).

Para tal, mensuramos a quantidade de glicose contida no meio antes e após a exposição aos condírios. Observamos que, durante as 4 horas de incubação das células, houve uma diminuição da glicose encontrada no sobrenadante quando comparada a quantidade inicial presente no meio, porém, não foram observadas diferenças nas quantidades de glicose no sobrenadante de nenhum dos grupos experimentais (Figura 16. A). Já os níveis de lactato encontrados no sobrenadante das células infectadas pré-expostas a 75 mM de etanol estavam elevados em relação às células infectadas do grupo controle (Figura 16. B). Este resultado pode indicar um aumento da glicólise induzida pela exposição ao etanol, como demonstrado por Morris e colaboradores, porém, novos experimentos precisam ser realizados para demonstrar se a exposição induz o aumento da quebra da glicose (Morris et al., 2022).



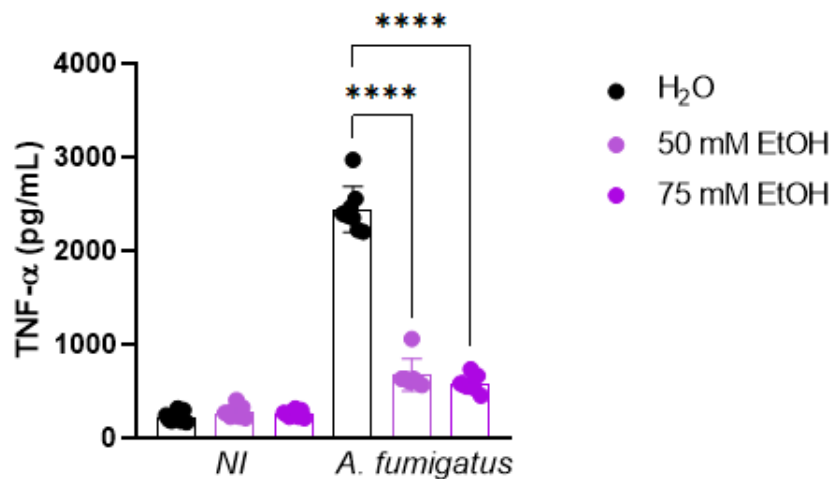
**Figura 16. Avaliação do efeito da exposição ao etanol na captura de glicose e produção de lactato.** Foram mensuradas as quantidades de (A) Glicose e (B) lactato no sobrenadante de macrófagos da linhagem RAW 264.7 ( $5 \times 10^4$  células) incubados com 75 mM de EtOH por 48 horas e 4 horas de exposição com  $2,5 \times 10^5$  conídios de *A. fumigatus*. \*Diferença significativa ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ).

Morris e colaboradores, em 2022, demonstraram que o aumento da expressão do Fator Induzível por Hipóxia 1 alfa (HIF1- $\alpha$ ), observado após a exposição de macrófagos alveolares ao etanol (0,08%), aumenta a expressão de genes relacionados a glicólise e está associado à diminuição da fagocitose de biopartículas de *Staphylococcus aureus* (Morris et al., 2022).

#### ***A exposição ao etanol inibe a produção de TNF- $\alpha$ pelos macrófagos durante infecção por *A. fumigatus****

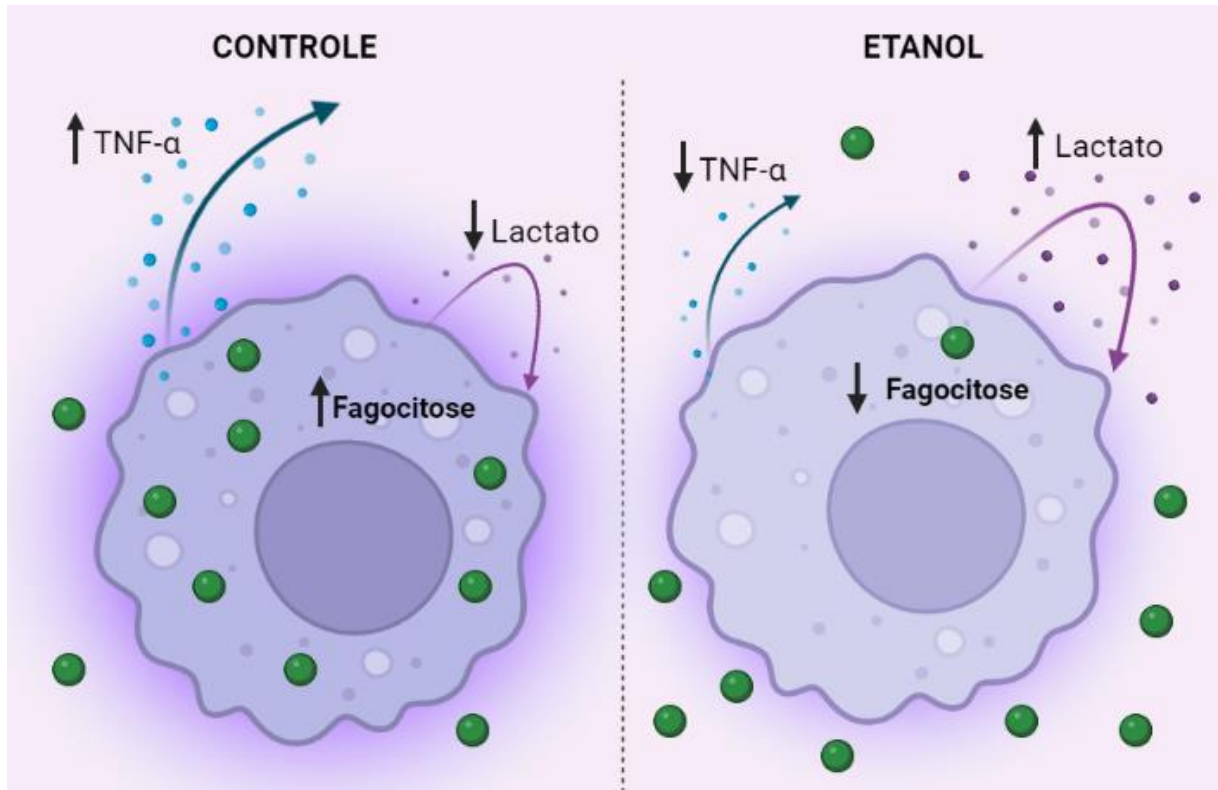
A importância do metabolismo celular na resposta imunológica durante a inflamação e homeostase tem sido amplamente estudada (Ganeshan & Chawla, 2014). O lactato, além de produto final da glicólise, tem uma função imunomoduladora importante durante o processo inflamatório (Selleri et al., 2016). O efeito de sua sinalização é associado com inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , por macrófagos após estímulo com LPS (Ratter et al., 2018). Em 2020, Yang e colaboradores demonstraram que a interação do Lactato com o receptor 81 associado à proteína G (GPR81) inibe a translocação de NF- $\kappa$ B para o núcleo, diminuindo a transcrição de genes como o de TNF- $\alpha$  and IL-6 (Yang et al., 2020).

Nossos dados demonstram que as células expostas a 50 mM e 75 mM de etanol apresentam uma inibição na produção de TNF- $\alpha$  após estímulo com *A. fumigatus* (Figura 17). Os níveis de IL-6 e IL-10 não foram detectados em nenhum dos grupos experimentais. A inibição da produção de TNF- $\alpha$  pode estar associada ao aumento da liberação de lactato pelas células tratadas com etanol, porém, mais experimentos são necessários para correlacionar a produção aumentada de lactato causada pelo consumo do álcool e a atividade inibitória dos macrófagos durante infecção por *A. fumigatus*.



**Figura 17. Dosagem da quantidade de TNF- $\alpha$  após exposição ao etanol.** A dosagem de TNF- $\alpha$  foi dosada do sobrenadante da cultura de macrófagos da linhagem RAW 264.7 ( $5 \times 10^4$  células), incubados com 50 e 75 mM de etanol por 48 horas e estimulados com  $2,5 \times 10^5$  conídios de *A. fumigatus* por 4 horas. \*\*\*\*Diferença significativa ( $p < 0,0001$ ).

No presente estudo, padronizamos a exposição *in vitro* ao etanol em macrófagos imortalizados com o propósito de estudar a função celular. Nossos dados demonstram que macrófagos expostos à 75 mM de etanol por 48 horas apresentam capacidade fagocítica diminuída, assim como diminuição da depuração fúngica e produção de TNF- $\alpha$ , que podem estar relacionadas à reprogramação metabólica e aumento da glicólise, demonstrada pelo aumento significativo de lactato pelas células tratadas com etanol (Figura 18).



**Figura 18.** Efeito da exposição aguda de macrófagos RAW 264.7 ao etanol. Em condições normais, o reconhecimento de PAMPs de *A. fumigatus* pelos PRRs dos macrófagos induzem a produção de TNF- $\alpha$ , a fagocitose e depuração dos conídios (esquema à esquerda). Após a exposição ao etanol, os macrófagos secretam uma maior quantidade lactato, que inibe a produção de TNF- $\alpha$ , a fagocitose e depuração fúngica (esquema à direita).



## CONCLUSÃO

O consumo crônico do etanol prejudica a migração, a fagocitose e a depuração fúngica de neutrófilos produzidos pela MO de animais quimera EtOH, aumenta a inflamação e o dano pulmonar encontrado nestes camundongos após infecção por *A. fumigatus*, e altera de forma persistente a produção de mediadores inflamatórios por macrófagos no pulmão. Esse fenótipo pode estar relacionado às alterações do controle da expressão gênica através de modificações epigenéticas, porém, mais experimentos são necessários para corroborar esta hipótese. Já a exposição aguda, *in vitro*, de macrófagos ao etanol apresentou caráter inibitório na fagocitose, depuração fúngica e produção de TNF- $\alpha$ , que pode estar relacionada ao aumento da glicólise nas células tratadas e infectadas. Ademais, independentemente da quantidade e frequência das exposições ao etanol, podemos observar uma diminuição da capacidade do sistema imunológico de lidar com a infecção causada por *A. fumigatus*, que pode explicar por que pessoas com histórico de consumo de etanol apresentam uma susceptibilidade a aspergilose pulmonar, e pode representar novos mecanismos alvo para o desenvolvimento de tratamentos paliativos ou terapêuticos para a população de alcoolistas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aimanianda, V. et al. Surface hydrophobin prevents immune recognition of airborne fungal spores. *Nature*. 460, 1117–1121 (2009).

Åke Norberg, A. Wayne Jones, Robert G. Hahn, Dr Johan L. Gabriëlsson (2003). Role of Variability in Explaining Ethanol Pharmacokinetics. , 42(1), 1–31. doi:10.2165/00003088-200342010-00001

Anatte Margalit, Kevin Kavanagh, The innate immune response to *Aspergillus fumigatus* at the alveolar surface, *FEMS Microbiology Reviews*, Volume 39, Issue 5, September 2015, Pages 670–687, <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv018>

Bagnardi V, Blangiardo M, La Vecchia C, Corrao G. Alcohol consumption and the risk of cancer: a meta-analysis. *Alcohol Res Health*. 2001;25(4):263-70. PMID: 11910703; PMCID: PMC6705703.

Bailey, K. L.; Samuelson, D. R.; Wyatt, T. A. Alcohol use disorder: A pre-existing condition for COVID-19? *Alcohol*, 2021. 90;11–17.

Barcelos, L. S., Talvani, A., Teixeira, A. S., Vieira, L. Q., Cassali, G. D., Andrade, S. P., & Teixeira, M. M. (2005). Impaired inflammatory angiogenesis, but not leukocyte influx, in mice lacking TNFR1. *Journal of Leukocyte Biology*, 78(2), 352–358. doi:10.1189/jlb.1104682

Bernstein J. The role of the lung in the metabolism of ethanol. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*. 1982 Oct;38(1):43-56. PMID: 7146621.

Blum J, Reed JC, Pizzo SV, Thompson WM. Miliary aspergillosis associated with alcoholism. *AJR Am J Roentgenol*. 1978 Oct;131(4):707-9. doi: 10.2214/ajr.131.4.707. PMID: 102168.

Bonnett CR, Cornish EJ, Harmsen AG, Burritt JB. 2006. Early neutrophil recruitment and aggregation in the murine lung inhibit germination of *Aspergillus fumigatus* Conidia. *Infect Immun* 74:6528–6539.

Brooks, P. J., & Zakhari, S. (2013). Acetaldehyde and the genome: Beyond nuclear DNA adducts and carcinogenesis. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 55(2), 77–91. doi:10.1002/em.21824

BROOKS, P. J., & ZAKHARI, S. Acetaldehyde and the genome: Beyond nuclear DNA adducts and carcinogenesis. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 2013. doi:10.1002/em.21824

Brown, G. D. et al. Hidden killers: human fungal infections. *Sci. Transl. Med.* 4, 165rv13 (2012).

Cederbaum, A. I. (2012). Alcohol Metabolism. *Clinics in Liver Disease*, 16(4), 667–685. doi:10.1016/j.cld.2012.08.002

CEDERBAUM, A. I. Alcohol Metabolism. *Clinics in Liver Disease*, 2012. 16(4), 667–

685. doi:10.1016/j.cld.2012.08.002

Centro de Informações sobre saúde e álcool -CISA. "Álcool e a Saúde dos Brasileiros - Panorama 2021". [https://cisa.org.br/images/upload/Panorama\\_Alcool\\_Saude\\_CISA2021.pdf](https://cisa.org.br/images/upload/Panorama_Alcool_Saude_CISA2021.pdf)

Cramer FB and Woodward GE. 2-deoxy-D-glucose as an antagonist of glucose in yeast fermentation. *J Franklin Inst* 253: 354–360, 1952.

Curtis BJ, Zahs A, Kovacs EJ. Epigenetic targets for reversing immune defects caused by alcohol exposure. *Alcohol Res.* 2013;35(1):97-113. PMID: 24313169; PMCID: PMC3860427.

D. J. Nutt, L. A. King, L. D. Phillips; Independent Scientific Committee on Drugs, Drug harms in the UK: A multicriteria decision analysis. *Lancet* 376, 1558–1565 (2010).

Dagenais TR, Keller NP. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis. *Clin Microbiol Rev.* 2009 Jul;22(3):447-65. doi: 10.1128/CMR.00055-08. PMID: 19597008; PMCID: PMC2708386.

Dagenais TR, Keller NP. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis. *Clin Microbiol Rev.* 2009 Jul;22(3):447-65. doi: 10.1128/CMR.00055-08. PMID: 19597008; PMCID: PMC2708386.

de Groot PW, Bader O, de Boer AD, Weig M, Chauhan N. Adhesins in human fungal pathogens: glue with plenty of stick. *Eukaryot Cell.* 2013 Apr;12(4):470-81. doi: 10.1128/EC.00364-12. Epub 2013 Feb 8. PMID: 23397570; PMCID: PMC3623432.

Edenberg HJ. The genetics of alcohol metabolism: role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase variants. *Alcohol Res Health.* 2007;30(1):5-13. PMID: 17718394; PMCID: PMC3860432.

Erwig, Lars P.; Gow, Neil A. R. (2016). Interactions of fungal pathogens with phagocytes. *Nature Reviews Microbiology*, (), -. doi:10.1038/nrmicro.2015.21

Ganeshan K, Chawla A. Metabolic regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol.* 2014;32:609-34. doi: 10.1146/annurev-immunol-032713-120236. PMID: 24655299; PMCID: PMC5800786.

Gaydos J, McNally A, Burnham EL. The impact of alcohol use disorders on pulmonary immune cell inflammatory responses to *Streptococcus pneumoniae*. *Alcohol.* 2019 Nov;80:119-130. doi: 10.1016/j.alcohol.2018.08.016. Epub 2018 Sep 5. PMID: 30195043; PMCID: PMC6401331.

Gaydos J, McNally A, Guo R, Vandivier RW, Simonian PL, Burnham EL. Alcohol abuse and smoking alter inflammatory mediator production by pulmonary and systemic immune cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2016 Mar 15;310(6):L507-18. doi: 10.1152/ajplung.00242.2015. Epub 2016 Jan 8. PMID: 26747782; PMCID: PMC4796259.

GILMORE, W. et al. Alcohol: taking a population perspective. *Nature reviews gastroenterology & hepatology*, 2016.

Global status report on alcohol and health 2018. Geneva: World Health Organization; 2018. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

Gross ER, Zambelli VO, Small BA, Ferreira JCB, Chen CH, Mochly-Rosen D. A personalized medicine approach for Asian Americans with the aldehyde dehydrogenase 2\*2 variant. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2015;55:107–127. pmid:25292432

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. Invasive aspergillosis in patients with severe alcoholic hepatitis. *J Hepatol*. 2014 Feb;60(2):267-74. doi: 10.1016/j.jhep.2013.09.011. Epub 2013 Sep 17. PMID: 24055548.

Gustot T., Lemmers A., Moreno C., Nagy N., Quertinmont E., Nicaise C., Franchimont D., Louis H., Devière J., Le Moine O. Differential liver sensitization to Toll-like receptor pathways in mice with alcoholic fatty liver. *Hepatology*. 2006;43:989–1000. doi: 10.1002/hep.21138.

Happel KI, Nelson S. Alcohol, immunosuppression, and the lung. *Proc Am Thorac Soc*. 2005; 2(5):428– 32. Epub 2005/12/03. <https://doi.org/10.1513/pats.200507-065JS> PMID: 16322595.

Haseba T, Okuda T, Maruyama M, Akimoto T, Duester G, Ohno Y. Roles of Two Major Alcohol Dehydrogenases, ADH1 (Class I) and ADH3 (Class III), in the Adaptive Enhancement of Alcohol Metabolism Induced by Chronic Alcohol Consumption in Mice. *Alcohol Alcohol*. 2020 Feb 7;55(1):11-19. doi: 10.1093/alcalc/agz091. PMID: 31825074.

Heap RE, Marín-Rubio JL, Peltier J, Heunis T, Dannoura A, Moore A, Trost M. Proteomics characterisation of the L929 cell supernatant and its role in BMDM differentiation. *Life Sci Alliance*. 2021 Apr 14;4(6):e202000957. doi: 10.26508/lsa.202000957. PMID: 33853969; PMCID: PMC8091624.

Hernández, José A.; López-Sánchez, Rosa C.; Rendón-Ramírez, Adela (2016). Lipids and Oxidative Stress Associated with Ethanol-Induced Neurological Damage. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016(), 1–15. doi:10.1155/2016/1543809

Hohl TM, Van Epps HL, Rivera A, Morgan LA, Chen PL, Feldmesser M, Pamer EG. *Aspergillus fumigatus* triggers inflammatory responses by stage-specific beta-glucan display. *PLoS Pathog*. 2005 Nov;1(3):e30. doi: 10.1371/journal.ppat.0010030. Epub 2005 Nov 18. PMID: 16304610; PMCID: PMC1287910.

Huang, J., Milton, A., Arnold, R. D., Huang, H., Smith, F., Panizzi, J. R., & Panizzi, P. (2016). Methods for measuring myeloperoxidase activity toward assessing inhibitor efficacy in living systems. *Journal of Leukocyte Biology*, 99(4), 541–548. doi:10.1189/jlb.3ru0615-256r

IBGE. Pesquisa Nacional de Saúde - PNS 2019. Rio de Janeiro: IBGE. 2020. [https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/media/com\\_mediaibge/arquivos/005355051927a647d3b01a5c8f735494.pdf](https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/media/com_mediaibge/arquivos/005355051927a647d3b01a5c8f735494.pdf)

Ibrahim-Granet, O., B. Philippe, H. Boleti, E. Boisvieux-Ulrich, D. Grenet, M. Stern, and J. P. Latge. 2003. Phagocytosis and intracellular fate of *Aspergillus fumigatus* conidia in

alveolar macrophages. *Infect. Immun.* 71:891-903.

Jean-Paul Latgé, Georgios Chamilos. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis in 2019. *Clinical microbiology reviews.* (2019). <https://doi.org/10.1128/CMR.00140-18>

Jeurissen S, Vogelaers D, Sermijn E, Van Dycke K, Geerts A, Van Vlierberghe H, Colle I. Invasive aspergillosis in patients with cirrhosis, a case report and review of the last 10 years. *Acta Clin Belg.* 2013 Sep-Oct;68(5):368-75. doi: 10.2143/ACB.3408. PMID: 24579244.

Johnstone, A. L., Andrade, N. S., Barbier, E., Khomtchouk, B. B., Rienas, C. A., Lowe, K., ... Wahlestedt, C. (2019). Dysregulation of the histone demethylase KDM6B in alcohol dependence is associated with epigenetic regulation of inflammatory signaling pathways. *Addiction Biology*, e12816. doi:10.1111/adb.12816

K. Witkiewitz, R. Z. Litten, L. Leggio, *Advances in the science and treatment of alcohol use disorder.* *Sci. Adv.* 5, eaax4043 (2019).

Kany S, Janicova A, Relja B. Innate Immunity and Alcohol. *J Clin Med.* 2019 Nov 14;8(11):1981. doi: 10.3390/jcm8111981. PMID: 31739600; PMCID: PMC6912266.

Kaphalia L, Calhoun WJ. Alcoholic lung injury: metabolic, biochemical and immunological aspects. *Toxicol Lett.* 2013 Oct 24;222(2):171-9. doi: 10.1016/j.toxlet.2013.07.016. Epub 2013 Jul 24. PMID: 23892124; PMCID: PMC3806189.

Karavitis J, Kovacs EJ. Macrophage phagocytosis: effects of environmental pollutants, alcohol, cigarette smoke, and other external factors. *J Leukoc Biol.* 2011 Dec;90(6):1065-78. doi: 10.1189/jlb.0311114. Epub 2011 Aug 30. PMID: 21878544; PMCID: PMC3236556.

Kazutoshi Shibuya, Tsunehiro Ando, Megumi Wakayama, Masayoshi Takaoka, Katsuhisa Uchida, Shiro Naoe, *Pathological Spectrum of Invasive Pulmonary Aspergillosis*, *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi*, 1997, Volume 38, Issue 2, Pages 175-181, Released on J-STAGE December 18, 2009, Online ISSN 1882-0476, Print ISSN 0916-4804, <https://doi.org/10.3314/jjmm.38.175>

KENDRICK, S. Acetate, the Key Modulator of Inflammatory Responses in Acute Alcoholic Hepatitis. *Hepatology*, 2010

KENDRICK, S. Acetate, the Key Modulator of Inflammatory Responses in Acute Alcoholic Hepatitis. *Hepatology*, 2010

KENDRICK, S.et al. Acetate, the Key Modulator of Inflammatory Responses in Acute Alcoholic Hepatitis. *Hepatology*, 2010

KHADERI, S. A. (2019). Introduction. *Clinics in Liver Disease*, 23(1), 1–10. doi:10.1016/j.cld.2018.09.009

Killgore, William D.S.et al. (2021). Alcohol dependence during COVID-19 lockdowns. *Psychiatry Research*, 296(), 113676–. doi:10.1016/j.psychres.2020.113676

Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2013 Mar;13(3):159-75. doi: 10.1038/nri3399. PMID:

23435331.

Kurtoglu, Metin; Maher, Johnathan C.; Lampidis, Theodore J. (2007). Differential Toxic Mechanisms of 2-Deoxy-D-Glucose versus 2-Fluorodeoxy-D -Glucose in Hypoxic and Normoxic Tumor Cells. *Antioxidants & Redox Signaling*, 9(9), 1383–1390. doi:10.1089/ars.2007.1714

Latgé Jean-Paul , Chamilos, Georgios . *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis in 2019. *Clinical microbiology reviews*. (2019). <https://doi.org/10.1128/CMR.00140-18>

Latgé JP, Beauvais A, Chamilos G. The Cell Wall of the Human Fungal Pathogen *Aspergillus fumigatus*: Biosynthesis, Organization, Immune Response, and Virulence. *Annu Rev Microbiol*. 2017 Sep 8;71:99-116. doi: 10.1146/annurev-micro-030117-020406. Epub 2017 Jul 12. PMID: 28701066.

LATGÉ, JP. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. *Clin Microbiol Rev*, 1999.

Lawrence, S. M., Corriden, R., & Nizet, V. (2018). The Ontogeny of a Neutrophil: Mechanisms of Granulopoiesis and Homeostasis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 82(1), e00057–17. doi:10.1128/membr.00057-17

Lewis SA, Doratt BM, Sureshchandra S, Jankeel A, Newman N, Shen W, Grant KA, Messaoudi I. Ethanol Consumption Induces Nonspecific Inflammation and Functional Defects in Alveolar Macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2022 Jul;67(1):112-124. doi: 10.1165/rcmb.2021-0346OC. PMID: 35380939; PMCID: PMC9273227.

Lieber, Charles S. (1996). [Advances in Pharmacology] Volume 38 || Role of Oxidative Stress and Antioxidant Therapy in Alcoholic and Nonalcoholic Liver Diseases. , (), 601–628. doi:10.1016/S1054-3589(08)61001-7

M. D. Levitt, R. Li, E. G. Demaster, M. Elson, J. Furne, and D. G. Levitt, “Use of measurements of ethanol absorption from stomach and intestine to assess human ethanol metabolism,” *American Journal of Physiology—Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 273, no. 4, pp. G951–G957, 1997.

Malacco NL, Souza JA, Mendes AC, Rachid MA, Kraemer LR, Mattos MS, Lima GN, Sousa LP, Souza DG, Pinho V, Teixeira MM, Russo RC, Soriani FM. Acute lung injury and repair induced by single exposure of *Aspergillus fumigatus* in immunocompetent mice. *Future Microbiol*. 2019 Nov;14:1511-1525. doi: 10.2217/fmb-2019-0214. Epub 2020 Jan 8. PMID: 31913059.

MALACCO NLSO et al. Eosinophil-Associated Innate IL-17 Response Promotes *Aspergillus fumigatus* Lung Pathology. *Front. Cell. Infect. Microbiol*, 2019

Malacco, N.L.S.O.; Souza, J.A.M.; Martins, F.R.B.; Rachid, M.A.; Simplicio, J.A.; Tirapelli, C.R.; Sabino, A.P.; Queiroz, C.M.; Goes, G.R.; Vieira, L.Q.; Souza, D.G.; Pinho, V; Teixeira, M.M.; Soriani, F.M. Chronic ethanol consumption compromises neutrophil function in acute pulmonary *Aspergillus fumigatus* infection. *Elife*, 2020.

Malacco, N.L.S.O.; Souza, J.A.M.; Martins, F.R.B.; Rachid, M.A.; Simplicio, J.A.;

Tirapelli, C.R.; Sabino, A.P.; Queiroz, C.M.; Goes, G.R.; Vieira, L.Q.; Souza, D.G.; Pinho, V; Teixeira, M.M.; Soriani, F.M. Chronic ethanol consumption compromises neutrophil function in acute pulmonary *Aspergillus fumigatus* infection. *Elife*, 2020.

Malacco, N.L.S.O.; Souza, J.A.M.; Martins, F.R.B.; Rachid, M.A.; Simplicio, J.A.; Tirapelli, C.R.; Sabino, A.P.; Queiroz, C.M.; Goes, G.R.; Vieira, L.Q.; Souza, D.G.; Pinho, V; Teixeira, M.M.; Soriani, F.M. Chronic ethanol consumption compromises neutrophil function in acute pulmonary *Aspergillus fumigatus* infection. *Elife*, 2020.

Malherbe DC, Messaoudi I. Transcriptional and Epigenetic Regulation of Monocyte and Macrophage Dysfunction by Chronic Alcohol Consumption. *Front Immunol.* 2022 Jun 29;13:911951. doi: 10.3389/fimmu.2022.911951. PMID: 35844518; PMCID: PMC9277054.

MARGALIT, A. KAVANAGH, K. The immune response to *Aspergillus fumigatus* at the alveolar surface. *FEMS microbiology Reviews*, 2015

Martin, F.P.; Jacqueline, C.; Poschmann, J.; Roquilly, A. Alveolar Macrophages: Adaptation to Their Anatomic Niche during and after Inflammation. *Cells* 2021, 10, 2720. <https://doi.org/10.3390/cells10102720>

McTernan PM, Levitt DE, Welsh DA, Simon L, Siggins RW, Molina PE. Alcohol Impairs Immunometabolism and Promotes Naïve T Cell Differentiation to Pro-Inflammatory Th1 CD4+ T Cells. *Front Immunol.* 2022 May 12;13:839390. doi: 10.3389/fimmu.2022.839390. PMID: 35634279; PMCID: PMC9133564.

Minzer, S., Losno, R. A., & Casas, R. (2020). The Effect of Alcohol on Cardiovascular Risk Factors: Is There New Information? *Nutrients*, 12(4), 912. doi:10.3390/nu12040912

Mircescu, M.M. L. Lipuma, N. van Rooijen, E.G. Pamer, T.M. Hohl, Essential role for neutrophils but not alveolar macrophages at early time points following *Aspergillus fumigatus* infection, *J. Infect. Dis.* 200 (2009) 647–656. doi:10.1086/600380.

Morris NL, Michael DN, Crotty KM, Chang SS, Yeligar SM. Alcohol-Induced Glycolytic Shift in Alveolar Macrophages Is Mediated by Hypoxia-Inducible Factor-1 Alpha. *Front Immunol.* 2022 May 11;13:865492. doi: 10.3389/fimmu.2022.865492. PMID: 35634337; PMCID: PMC9130492.

Nelson, Steve; Zhang, Ping; Bagby, Gregory; Happel, Kyle; Raasch, Caroline (2008). Alcohol Abuse, Immunosuppression, and Pulmonary Infection. *Current Drug Abuse Reviewse*, 1(1), 56–67. doi:10.2174/1874473710801010056

Nosanchuk, J. D. & Casadevall, A. Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 3519–3528 (2006).

Oak S., Mandrekar P., Catalano D., Kodys K., Szabo G. TLR2-and TLR4-mediated signals determine attenuation or augmentation of inflammation by acute alcohol in monocytes. *J. Immunol.* 2006;176:7628–7635. doi: 10.4049/jimmunol.176.12.7628.

P.-Y. Bochud, J.W. Chien, K.A. Marr, W.M. Leisenring, A. Upton, M. Janer, et al.,

Toll-like receptor 4 polymorphisms and aspergillosis in stem-cell transplantation, *N. Engl. J. Med.* 359 (2008) 1766–1777. doi:10.1056/NEJMoa0802629.

Phadke AP, Mehrad B. Cytokines in host defense against *Aspergillus*: recent advances. *Med Mycol.* 2005 May;43 Suppl 1:S173-6. doi: 10.1080/13693780500052099. PMID: 16110808.

Pirofski LA, Casadevall A. The damage-response framework of microbial pathogenesis and infectious diseases. *Adv Exp Med Biol.* 2008;635:135-46. doi: 10.1007/978-0-387-09550-9\_11. PMID: 18841709; PMCID: PMC7123708.

Poole LG, Beier JI, Torres-Gonzales E, Schlueter CF, Hudson SV, Artis A, Warner NL, Nguyen-Ho CT, Dolin CE, Ritzenthaler JD, Hoyle GW, Roman J, Arteel GE. Chronic + binge alcohol exposure promotes inflammation and alters airway mechanics in the lung. *Alcohol.* 2019 Nov;80:53-63. doi: 10.1016/j.alcohol.2018.10.008. Epub 2018 Nov 14. PMID: 30445135; PMCID: PMC6513731.

Price, M. E., Gerald, C. L., Pavlik, J. A., Schlichte, S. L., Zimmerman, M. C., Devasure, J. M., ... Sisson, J. H. (2018). Loss of cAMP-dependent stimulation of isolated cilia motility by alcohol exposure is oxidant dependent. *Alcohol.* doi:10.1016/j.alcohol.2018.09.010

RAASCH et al. Acute Alcohol Intoxication Impairs the Hematopoietic Precursor Cell Response to Pneumococcal Pneumonia. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 2010.

Rajendram R, Rajendram R, Preedy VR. Ethanol Metabolism and Implications for Disease. In: Preedy V, editor. *Neuropathology of Drug Addictions and Substance Misuse*. Academic Press; 2016. p. 377–388.

Rajendram R, Rajendram R, Preedy VR. Ethanol Metabolism and Implications for Disease. In: Preedy V, editor. *Neuropathology of Drug Addictions and Substance Misuse*. Academic Press; 2016. p. 377–388.

Raschke WC, Baird S, Ralph P, Nakoinz I. Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. *Cell.* 1978 Sep;15(1):261-7. doi: 10.1016/0092-8674(78)90101-0. PMID: 212198.

Ratter JM, Rooijackers HMM, Hooiveld GJ, et al. In vitro and in vivo effects of lactate on metabolism and cytokine production of human primary PBMCs and monocytes. *Front Immunol.* 2018;9:2564. doi:10.3389/fimmu.2018.02564

Rehm J, Room R, Monteiro M, Gmel G, Graham K, Rehn N, Sempos CT, Jernigan D. Alcohol as a risk factor for global burden of disease. *Eur Addict Res.* 2003 Oct;9(4):157-64. doi: 10.1159/000072222. PMID: 12970584.

S.-L. Lee, G.-Y. Chau, C.-T. Yao, C.-W. Wu, and S.-J. Yin, “Functional assessment of human alcohol dehydrogenase family in ethanol metabolism: significance of first-pass metabolism,” *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, vol. 30, no. 7, pp. 1132–1142, 2006.



SAMUELSON, D. et al. Alcohol-associated intestinal dysbiosis impairs pulmonary host defense against *Klebsiella pneumoniae*. *PLOS Pathogens*, 2017.

Schaffner, A., H. Douglas, and A. Braude. 1982. Selective protection against conidia by mononuclear and against mycelia by polymorphonuclear phagocytes in resistance to *Aspergillus*. Observations on these two lines of defense in vivo and in vitro with human and mouse phagocytes. *J. Clin. Investig.* 69:617-631.

Schoch CL, et al. NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database (Oxford)*. 2020: baaa062. PubMed: 32761142 PMC: PMC7408187.

Selleri S, Bifsha P, Civini S, Pacelli C, Dieng MM, Lemieux W, Jin P, Bazin R, Patey N, Marincola FM, Moldovan F, Zaouter C, Trudeau LE, Benabdhalha B, Louis I, Beauséjour C, Stroncek D, Le Deist F, Haddad E. Human mesenchymal stromal cell-secreted lactate induces M2-macrophage differentiation by metabolic reprogramming. *Oncotarget*. 2016 May 24;7(21):30193-210. doi: 10.18632/oncotarget.8623. PMID: 27070086; PMCID: PMC5058674.

SISSON JH. Alcohol and airways function in health and disease. *Alcohol*, 2007.

Soriani, F. M. et al. Functional characterization of the *Aspergillus fumigatus* CRZ1 homologue, CrzA. *Molecular Microbiology*, 2008.

SORIANI, F. M. et al. Functional characterization of the *Aspergillus fumigatus* CRZ1 homologue, CrzA. *Molecular Microbiology*, 2008.

Strath, M., Warren, D. J., & Sanderson, C. J. (1985). Detection of eosinophils using an eosinophil peroxidase assay. Its use as an assay for eosinophil differentiation factors. *Journal of Immunological Methods*, 83(2), 209–215. doi:10.1016/0022-1759(85)90242-x

Suwatanapongched T, Visoottiviseth Y, Watcharananan SP, Kanoksil W, Muntham D, Pornsuriyasak P. Clinical characteristics and CT manifestations of invasive pulmonary aspergillosis in hospitalised patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Radiol*. 2021 Jul;76(7):548.e13-548.e23. doi: 10.1016/j.crad.2021.01.006. Epub 2021 Feb 18. PMID: 33610288.

Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*. 2010 Mar 19;140(6):805-20. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.022. PMID: 20303872.

Tischler BY, Hohl TM. Menacing Mold: Recent Advances in *Aspergillus* Pathogenesis and Host Defense. *J Mol Biol*. 2019 Oct 4;431(21):4229-4246. doi: 10.1016/j.jmb.2019.03.027. Epub 2019 Apr 4. PMID: 30954573; PMCID: PMC6776734.

Tischler BY, Tosini NL, Cramer RA, Hohl TM (2020) Platelets are critical for survival and tissue integrity during murine pulmonary *Aspergillus fumigatus* infection. *PLOS Pathogens* 16(5): e1008544. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008544>

Trouplin, V., Boucherit, N., Gorvel, L., Conti, F., Mottola, G., Ghigo, E. Bone Marrow-derived Macrophage Production. *J. Vis. Exp.* (81), e50966, doi:10.3791/50966 (2013).

V. Balloy, M. Si-Tahar, O. Takeuchi, B. Philippe, M.-A. Nahori, M. Tanguy, et al.,

Involvement of toll-like receptor 2 in experimental invasive pulmonary aspergillosis, *Infect. Immun.* 73 (2005) 5420–5425. doi:10.1128/IAI.73.9.5420-5425.2005.

Venter G, Oerlemans FTJJ, Wijers M, Willemsse M, Fransen JAM, et al. (2014) Glucose Controls Morphodynamics of LPS-Stimulated Macrophages. *PLOS ONE* 9(5): e96786. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096786>

Walsh TJ, Roilides E, Cortez K, Kottlilil S, Bailey J, Lyman CA. Control, immunoregulation, and expression of innate pulmonary host defenses against *Aspergillus fumigatus*. *Med Mycol.* 2005 May;43 Suppl 1:S165-72. doi: 10.1080/13693780500064672. PMID: 16114132.

Wang J, Jiang L, Sun H (2021) Early evidence for beer drinking in a 9000-year-old platform mound in southern China. *PLOS ONE* 16(8): e0255833. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0255833>

Yang K, Xu J, Fan M, Tu F, Wang X, Ha T, Williams DL, Li C. Lactate Suppresses Macrophage Pro-Inflammatory Response to LPS Stimulation by Inhibition of YAP and NF- $\kappa$ B Activation via GPR81-Mediated Signaling. *Front Immunol.* 2020 Oct 6;11:587913. doi: 10.3389/fimmu.2020.587913. PMID: 33123172; PMCID: PMC7573489.

YELIGAR, S. M. et al. Etanol induces oxidative stress in alveolar macrophages via upregulation of NADPH oxidases. *Journal of immunology*, 2012.

Yeligar, Samantha M.; Chen, Michael M.; Kovacs, Elizabeth J.; Sisson, Joseph H.; Burnham, Ellen L.; Brown, Lou Ann S. (2016). Alcohol and Lung Injury and Immunity. *Alcohol*, (), S074183291630074X-. doi:10.1016/j.alcohol.2016.08.005

Zhang T, Zhu X, Wu H, Jiang K, Zhao G, Shaukat A, Deng G, Qiu C. Targeting the ROS/PI3K/AKT/HIF-1 $\alpha$ /HK2 axis of breast cancer cells: Combined administration of Polydatin and 2-Deoxy-d-glucose. *J Cell Mol Med.* 2019 May;23(5):3711-3723. doi: 10.1111/jcmm.14276. Epub 2019 Mar 28. PMID: 30920152; PMCID: PMC6484306.

Zhou C., Zhao J., Li J., Wang H., Tang C. Acute ethanol administration inhibits Toll-like receptor 4 signaling pathway in rat intestinal epithelia. *Alcohol.* 2013;47:231–239. doi: 10.1016/j.alcohol.2013.01.003.

Zhu L, Pei W, Thiele I, Mahadevan R (2021) Integration of a physiologically-based pharmacokinetic model with a whole-body, organ-resolved genome-scale model for characterization of ethanol and acetaldehyde metabolism. *PLOS Computational Biology* 17(8): e1009110. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1009110>

## ANEXO A



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

**Protocolo CEUA:** 271/2019**Título do projeto:** Caracterização do efeito do consumo do crônico do etanol nas células hematopoiéticas de transplantados na infecção por *Aspergillus fumigatus***Finalidade:** Pesquisa**Pesquisador responsável:** Frederico Marianetti Soriani**Unidade:** Instituto de Ciências Biológicas**Departamento:** Departamento de Biologia Geral**Situação atual:** [Decisão Final - Aprovado](#)

Aprovado na reunião do dia 04/11/2019. Validade: 04/11/2019 à 03/11/2024  
Belo Horizonte, 04/11/2019.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

[https://aplicativos.ufmg.br/solicite\\_ceua/](https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/)

Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil  
Telefone: (31) 3409-4516  
[www.ufmg.br/bioetica/ceua](http://www.ufmg.br/bioetica/ceua) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)