

---

**Ministério da Saúde**  
**Fundação Oswaldo Cruz**  
**Centro de Pesquisas René Rachou**  
**Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

**IMPACTO DA ADMINISTRAÇÃO INTRAGÁSTRICA AGUDA DE  
ETANOL SOBRE CÉLULAS APRESENTADORAS DE ANTÍGENOS E  
LINFÓCITOS T MURINOS**

**MARIA JÚLIA SILVA ALBERNAZ**

**Belo Horizonte**  
**Maio de 2008**

---

**Ministério da Saúde**  
**Fundação Oswaldo Cruz**  
**Centro de Pesquisas René Rachou**  
**Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

**IMPACTO DA ADMINISTRAÇÃO INTRAGÁSTRICA AGUDA DE  
ETANOL SOBRE CÉLULAS APRESENTADORAS DE ANTÍGENOS E  
LINFÓCITOS T MURINOS**

**MARIA JÚLIA SILVA ALBERNAZ**

Dissertação apresentada com vistas à obtenção do  
Título de Mestre em Ciências na área de  
concentração Biologia Celular e Molecular.

Orientação: Dr. Olindo Assis Martins-Filho

Co-orientação: Dra. Mariléia Chaves Andrade

**Belo Horizonte**

**Mai de 2008**

---

Catálogo-na-fonte  
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ  
Biblioteca do CPqRR  
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

A331i      Albernaz, Maria Júlia Silva.  
2008

Impacto da administração intragástrica aguda de etanol sobre células apresentadoras de antígenos e linfócitos T Murinos / Maria Júlia Silva Albernaz . – Belo Horizonte, 2008.

xvii, 60 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f.: 70 – 77

Dissertação (Mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

1. Etanol/envenenamento 2. Antígenos/imunologia  
3. Linfócitos T/imunologia 4. Homeostase/imunologia I.  
Título. II. Martins-Filho, Olindo Assis (Orientação) III.  
Andrade, Mariléia Chaves Andrade (Co-orientação)

CDD – 22. ed. – 616.079 2

---

**Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Centro de Pesquisas René Rachou  
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

**IMPACTO DA ADMINISTRAÇÃO INTRAGÁSTRICA AGUDA DE  
ETANOL SOBRE CÉLULAS APRESENTADORAS DE ANTÍGENOS E  
LINFÓCITOS T MURINOS**

**por  
MARIA JÚLIA SILVA ALBERNAZ**

**Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:**

**Prof. Dr. Olindo Assis Martins Filho - CPqRR/FIOCRUZ (Presidente)  
Prof. Dra. Denise da Silveira Lemos - CPqRR/FIOCRUZ  
Prof. Dra. Elaine Speziali de Faria - UNIVALE  
Suplente: Dra. Isabela Penna Cerávolo – CPqRR/FIOCRUZ**

**Dissertação defendida e aprovada em: 12/05/08**

---

**“A parte que ignoramos é muito maior que tudo quanto sabemos”.**

**Platão**

---

## **Dedicatória**

**Aos meus pais.**

---

---

## Agradecimentos

**Ao Dr. Olindo Assis Martins Filho pela orientação, paciência, pelos ensinamentos, pelos puxões de orelha nas horas certas e por sua genialidade. Foi um privilégio ter sido orientada por você, com quem tanto aprendi, e não só sobre imunologia. Muito obrigada!**

**À Dra. Mariléia Chaves Andrade pelo aprendizado, paciência e pela forma tão especial de orientar, sempre com alegria e sem, entretanto, deixar de lado o profissionalismo. Sinto-me também privilegiada por ter contado com a sua orientação e por ter podido compartilhar de sua sabedoria. Muito obrigada!**

**Aos colaboradores Dra. Ana Maria Caetano de Faria e Dr. Márcio Sobreira, que muito contribuíram para a realização deste trabalho.**

**Às técnicas Eliandra Soares e Lisiane Gomes pela competência, paciência, disponibilidade e por todo o auxílio na parte experimental deste trabalho.**

**A todos os amigos que já fizeram ou fazem parte da equipe do Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração. Especialmente a Lisiane, Roberta Félix, Márcio, Ana Paula Wendling, Cristiane, Jerusa, Dani, Renato, Renata, Jordana, Paula, Matheus, Mariana e Luciana. Agradeço pelas contribuições de cada um para o meu desenvolvimento profissional e pessoal, pela amizade e pela atenção. Muito obrigada por tornarem o nosso ambiente de trabalho tão agradável e o nosso trabalho muito mais prazeroso.**

**À Roberta Félix pela competência na realização de seu trabalho, pelo auxílio nas questões burocráticas e pela disponibilidade.**

**Ao Dr. Márcio Sobreira pelo auxílio na realização de experimentos, pela paciência, pelo aprendizado e pelas correções e sugestões. Ao Márcio pela amizade, pelas conversas e conselhos, pelos petiscos e por sua alegria contagiante.**

**Ao Dr. Paulo Pimenta, chefe do Laboratório de Entomologia Médica do Instituto René Rachou, por possibilitar a utilização do microscópio confocal localizado em seu laboratório.**

**À Tatiana Aguiar pelo auxílio na análise das lâminas de microscopia confocal.**

**Ao Dr. Rodrigo Corrêa Oliveira, chefe do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do Instituto René Rachou, por possibilitar a utilização do espectrofotômetro localizado em seu laboratório.**

**À Dra. Andréa Teixeira e a Matheus Fernandes pelo auxílio na utilização do espectrofotômetro.**

**À Tiza pelo auxílio na utilização do citômetro de fluxo.**

---

---

**À equipe dos Biotérios de Produção e Experimentação do Instituto René Rachou pelo fornecimento e manutenção dos camundongos utilizados na parte experimental deste trabalho.**

**À equipe do Biotério de Produção por tudo o que aprendi durante o período em que lá permaneci como estagiária.**

**À Frankinéia Assis pela disponibilidade e pelas preciosas informações técnicas.**

**À Kelly Alves Bicalho pela primeira oportunidade no Instituto René Rachou e pelo aprendizado.**

**Às secretárias da pós-graduação Cristiane Gomes e Andréa Dias pela eficiência, pela gentileza e pela disponibilidade.**

**Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou pelo aprendizado.**

**Aos colegas da pós-graduação pelo companheirismo durante o curso. À Luanda, em especial, pela amizade, pelas conversas e pelo carinho.**

**A Segemar Oliveira pelo auxílio nas pesquisas bibliográficas e pelos artigos.**

**À equipe do Setor de Informática pelo auxílio e pela disponibilidade.**

**Aos funcionários do Instituto René Rachou.**

**Aos meus pais, cujo incentivo foi de fundamental importância para a realização deste trabalho, por todo o amor a mim devotado, pela paciência e pelo carinho. Por terem me dado as bases sem as quais eu não poderia ter chegado até aqui. Sem vocês, nada teria sido possível. Muito obrigada por tudo!**

**À minha família pelo apoio e pelo carinho. Às minhas avós, tios, tias, primos e primas, muito obrigada.**

**À Glória Teles pela amizade, carinho, paciência, incentivo e cuidado. Muito obrigada.**

**Ao Feijão por ser exatamente como ele é e por tornar os meus dias mais felizes.**

**A todos os meus amigos pelo apoio e pelo carinho. A amizade de vocês é vital para mim. “Eu poderia suportar, embora não sem dor, que tivessem morrido todos os meus amores, mas enlouqueceria se morressem todos os meus amigos!” Agradeço especialmente à Verônica, Lu, Marina, Paula, Dani e Francine.**

**Á Francine Costa Assis por ter me auxiliado na preparação para o processo seletivo do mestrado. Muito obrigada!**

**Aos amigos da Biologia pelo incentivo e pelo carinho. Dani, Fran, Tião, Paula, Bruno, Glauco, Thiago, Sorriso, Karlinha, André Matos, André Vinícius, Vinícius... Muito obrigada!**



---

---

**À Joana D'arc por me ajudar a reconquistar noites de sono bem dormidas, pelo apoio e carinho.**

**À Paula Souza Lage por todo o apoio, carinho e amizade. Por sempre me incentivar e por ter compartilhado comigo as alegrias e as dores do mestrado. Muito obrigada!**

**À Felipe Diniz Ramalho e família por todo o apoio e carinho durante o processo seletivo e ao longo do primeiro ano do curso de mestrado. Muito obrigada!**

**À Camila Campos pelo apoio, pelo carinho, pelas conversas e pelo companheirismo nesta etapa final. Muito obrigada!**

**À capoeira, que tanto contribui para o meu equilíbrio físico e mental e aos amigos que “ela” me deu. Agradeço especialmente, pelo carinho e pelo incentivo, a Bio, Mangá, Maritaca, Liloca, Pri, Pulga e Doutor. Ao Mestre Boca de Peixe pelo apoio e pela paciência nesses últimos meses. Muito obrigada! “Sem capoeira eu não posso viver, sou peixe fora do mar, passarinho sem voar, dia sem escurecer”.**

**Aos cantores, compositores e instrumentistas da Música Popular Brasileira, que embala o meu dia-a-dia, deixando tudo mais leve.**

**A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.**

**À vida.**

---

---

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>XII</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>XIII</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....</b>	<b>XIV</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>XVI</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>XVII</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>18</b>
1.1 Breve histórico do consumo do álcool no mundo .....	18
1.2 O consumo do álcool e suas conseqüências fisiológicas.....	20
1.3 Efeitos do álcool sobre o sistema imune .....	21
1.4 Aspectos fenotípicos e funcionais de células apresentadoras de antígenos e linfócitos T CD4 <sup>+</sup> .....	24
1.5 Justificativa e abordagem racional do estudo.....	31
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>32</b>
2.1 Objetivo geral .....	32
2.2 Objetivos específicos.....	32
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>33</b>
3.1 Animais.....	33
3.2 Modelo de administração oral de etanol (EtOH).....	33
3.3 Obtenção e preparo de suspensões celulares .....	33
3.3.1 <i>Suspensão celular enriquecida de macrófagos peritoneais</i> .....	33
3.3.2 <i>Suspensão celular de baço</i> .....	34
3.4 Contagem das células viáveis .....	35
3.5 Detecção de citocinas intracitoplasmáticas em macrófagos peritoneais pela Citometria de Fluxo .....	36
3.6 Análise da fagocitose de <i>Leishmania</i> por macrófagos peritoneais <i>in vitro</i> .....	37
3.7 Análise da endocitose de OVA por APCs <i>in vitro</i> .....	38
3.7.1 <i>Marcação da proteína Ovalbumina com FITC</i> .....	38
3.7.2 <i>Análise da endocitose de OVA-FITC por macrófagos, células dendríticas e         linfócitos B esplênicos in vitro pela citometria de fluxo</i> .....	39
3.7.3 <i>Análise da endocitose de OVA-FITC por macrófagos, células dendríticas e         linfócitos B esplênicos in vitro pela microscopia confocal</i> .....	39
3.7.3.1 <i>Preparo das lâminas para análise da endocitose de OVA-FITC por macrófagos,             células dendríticas e linfócitos B esplênicos in vitro pela microscopia confocal</i> .....	40

---

---

3.8	Imunofenotipagem celular pela Citometria de Fluxo no contexto <i>ex- vivo</i> .....	40
3.9	Análise estatística .....	41
<b>4</b>	<b>ANÁLISE DOS DADOS OBTIDOS PELA CITOMETRIA DE FLUXO .....</b>	<b>42</b>
4.1	Identificação fenotípica de células dendríticas.....	42
4.2	Identificação fenotípica de macrófagos.....	45
4.3	Identificação fenotípica de linfócitos.....	47
<b>5</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>48</b>
5.1	Estudo das alterações funcionais em células apresentadoras de antígenos peritoneais após a administração intragástrica aguda de etanol.....	48
5.2	Estudo das alterações fenotípicas e funcionais em células apresentadoras de antígenos esplênicas após a administração intragástrica aguda de etanol .....	52
5.3	Estudo das alterações fenotípicas em linfócitos T esplênicos após a administração intragástrica aguda de etanol. ....	58
5.4	Síntese dos resultados .....	61
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>62</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>68</b>
7.1	Análise funcional de células apresentadoras de antígenos peritoneais.....	68
7.2	Análise imunofenotípica e funcional de células apresentadoras de antígenos esplênicas .....	68
7.3	Análise fenotípica de linfócitos esplênicos .....	68
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>70</b>

---

---

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estratégia de análise de células dendríticas mielóides.....	43
Figura 2 - Estratégia de análise de células dendríticas linfóides. ....	45
Figura 3- Estratégia de análise de macrófagos. ....	46
Figura 4 - Estratégia de análise convencional para identificação de marcadores imunofenotípicos em linfócitos T.....	47
Figura 5 - Análise da produção de IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-4 e IL-10 por macrófagos peritoneais após estimulação in vitro. ....	49
Figura 6 - Análise da fagocitose (in vitro) de Leishmanias por macrófagos peritoneais através da citometria de fluxo. ....	51
Figura 7 - Análise da intensidade média de fluorescência (IMF) das moléculas TLR-2, TLR-4, CD40, CD80 e CD86 em populações de APCs no baço. ....	53
Figura 8 - Análise da endocitose (in vitro) de OVA por macrófagos, células dendríticas esplênicas e linfócitos B através da citometria de fluxo.....	55
Figura 9. Imagem confocal de APCs incubadas com OVA-FITC. ....	57
Figura 10 - Análise da intensidade de expressão das moléculas CD25 e CD62L em linfócitos TCD4+ do baço. ....	59
Figura 11- Análise da intensidade de expressão das moléculas LAP, TLR-2 e TLR-4 na população de linfócitos TCD4+ do baço. ....	60
Figura 12 – Alterações fenotípicas e funcionais observadas no grupo tratado com etanol em relação ao grupo tratado com salina. ....	61

---

---

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Diluição padrão de anticorpos para imunofenotipagem celular por citometria de fluxo no contexto ex-vivo.....	37
Tabela 2 – Diluição padrão de anticorpos utilizados para detecção de citocinas intracitoplasmáticas em macrófagos peritoneais pela citometria de fluxo.....	41

---

---

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

APC - Células apresentadora de antígenos (Antigen Presenting Cell)

IL – Interleucinas (Interleukins)

TNF-alfa – Fator de necrose tumoral-alfa (Tumor Necrosis Factor-alfa)

CD – Grupos de diferenciação (Clusters of Differentiation)

TLR – Receptor do tipo toll (Toll- like receptor)

LAP- Latency- associated protein

AVC- Acidente vascular cerebral

NK- Natural killer

MIP-2- Macrophage-inflammatory protein-2

IFN-g- Interferon-g

MHC II- Complexo de histocompatibilidade principal-II (Major histocompatibility complex)

PAMPs- Padrões moleculares associados a patógenos (Pathogen associated molecular patterns)

PRRs- Receptores de reconhecimento padrão (Pattern-recognition receptors)

M-CSF- Fator estimulador de colônia de macrófago (Macrophage colony stimulating factor)

GM-CSF- Fator estimulador de colônia de granulócito-macrófago (Granulocyte-macrophage colony stimulating factor)

BCR- Receptor de célula B (B cell receptor)

TCR- Receptor de célula T (T cell receptor)

LPS- Lipopolissacarídeo (Lipopolysaccharide)

CTLA-4- Cytotoxic T lymphocyte antigen-4

IL-2R-Receptor da IL-2 (Interleukin-2 receptor)

TGF-b- Fator de crescimento transformante-b (Transforming growth factor-b)

LTBP- Latent TGF-beta binding protein

OVA- Ovalbumina

FITC- Isotiocianato de Fluoresceína (Fluorescein isothiocyanate)

EtOH- Etanol

NaCl- Cloreto de sódio

PBS- Tampão fosfato (Phosphate buffered saline)

SFB- Soro fetal bovino

PMA- Phorbol myristate acetate

---

EDTA- Ethylenediamine tetraacetic acid  
PE- Ficoeritrina (Phicoeritrin)  
MFF- Macs Facs Fix  
DC- Célula dendrítica (Dendritic cell)  
R1, R2, R3- Região 1, Região 2, Região 3  
FSC- Forward scatter  
SSC- Side scatter  
IMF- Intensidade Média de Fluorescência  
UR- Up right  
FL-1- Fluorescência-1  
LFA-1- Lymphocyte function-associated antigen-1  
EP- Erro padrão  
Th1- T helper 1  
Th2- T helper 2

---

---

## RESUMO

O consumo agudo do etanol exerce grande impacto sobre as atividades do sistema imune, levando a alterações que interferem na homeostase imunológica. As células apresentadoras de antígenos possuem um papel fundamental na determinação da função efetora de linfócitos T, direcionando o perfil dessas células para a tolerância ou para a inflamação. Alterações na distribuição e função das APCs podem comprometer ou estimular a geração de linfócitos T com características inflamatórias ou reguladoras. Utilizando um modelo agudo de administração de etanol descrito por Andrade e colaboradores (2006), demonstramos que os animais tratados com etanol apresentaram modificações funcionais relacionadas com uma menor produção de citocinas (IL-4, IL-12 e TNF- $\alpha$ ) por macrófagos, uma diminuição na atividade fagocitária e endocítica de macrófagos e células dendríticas, e interessantemente, um aumento na atividade endocítica de linfócitos B. Além disso, destacam-se alterações imunofenotípicas seletivas na população de macrófagos, relacionadas com a diminuição na intensidade de expressão de CD40 e TLR-2. O consumo agudo do etanol repercutiu também sobre a população de linfócitos T, levando a um predomínio de um perfil inflamatório caracterizado pelo aumento de moléculas de ativação celular, como CD25, e por uma diminuição de moléculas associadas com atividades reguladoras em linfócitos T CD4<sup>+</sup>, tais como LAP e TLR-2. Em conjunto, acreditamos que as alterações imunofenotípicas e funcionais nas APCs após o tratamento com etanol, podem comprometer a geração de linfócitos T com atividades reguladoras e induzir o predomínio de um perfil celular inflamatório.



---

## ABSTRACT

Ethanol acute consumption exerts great impact on the immune system activities, leading to changes that interfere in immune homeostasis. Antigen presenting cells (APCs) have a key role in determining the effector function of T lymphocytes, directing the profile of these cells to tolerance or to inflammation. Changes in the distribution and function of APCs may compromise or stimulate the generation of T lymphocytes with either inflammatory or regulatory characteristics. Using a model of acute administration of ethanol described by Andrade and collaborators (2006), we have demonstrated that animals treated with ethanol presented functional changes related to a lower production of cytokines (IL-4, IL-12 e TNF- $\alpha$ ) by macrophages, a decrease in phagocytic and endocytic activity of macrophages and dendritic cells and, interestingly, an increase in endocytic activity of B lymphocytes. In addition, we also observed selective immunophenotypical alterations in the population of macrophages, related to the decrease in the intensity of expression of CD40 and TLR-2. Ethanol acute consumption lead also alterations on T lymphocyte populations, leading to a predominance of an inflammatory profile characterized by the increase of activation molecules, such as CD25, and by the decrease of molecules associated with regulatory activities in CD4 T lymphocytes such as LAP and TLR-2. Taken together, we believe that immunophenotypical and functional changes in APCs after treatment with ethanol, can compromise the generation of T lymphocytes with regulatory activities and induce the predominance of a cellular inflammatory profile.

---

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Breve histórico do consumo do álcool no mundo

Embora ninguém saiba quando exatamente a bebida alcoólica foi utilizada pela primeira vez, o seu descobrimento foi possivelmente acidental, sendo resultado de um processo natural de fermentação de frutos ou grãos há pelo menos dezenas de milhares de anos atrás. A produção intencional de bebidas fermentadas, de acordo com registros, aparece pela primeira vez no Período Neolítico (10.000 a.C.) (Viala-Artigues & Mechetti, 2003; Hanson, 1995; Patrick, 1952), tendo sido de marcante importância no início da civilização, no Antigo Egito (3.100 – 30 a.C.), época em que foram produzidos pelo menos 17 variedades de cerveja e 24 variedades de vinho. Os valores agregados às bebidas alcoólicas foram evidenciados pela variedade de costumes e regulamentos que se desenvolveram em torno de sua produção e consumo (Bacon, 1965). As bebidas alcoólicas produzidas eram utilizadas como fonte de prazer e de nutrição, bem como em rituais de nascimento e morte, em cerimônias religiosas pagãs e ainda para fins medicinais e comerciais (Hanson, 1995; Cherrington, 1925). Entretanto, o consumo do álcool passou a ser associado também à geração de problemas como acidentes, doenças e discórdias, tendo sido alvo de intensa regulação social (Millikan, 1999). O consumo moderado de álcool era não só aceito, mas incentivado nessa época. Na China, um decreto imperial de cerca de 1.116 a.C. deixa claro que o consumo moderado de álcool foi acreditado ser prescrito pelos céus (Hanson, 1995). O álcool foi também amplamente consumido de maneira indiscriminada por povos gregos e romanos, que encorajavam a ingestão excessiva de vinho por meio de práticas tais como beber de estômago vazio e induzir o vômito para permitir o consumo de mais bebida (Viala-Artigues & Mechetti, 2003; Babor, 1986).

Com o início do cristianismo e o gradual enfraquecimento das religiões anteriormente dominantes, os comportamentos relacionados à bebida passaram a ser influenciado pelo Novo Testamento (Viala-Artigues & Mechetti, 2003; Babor, 1986). Há relatos de que Jesus consumia vinho e aprovava o seu consumo moderado pelas pessoas, porém era um severo repressor da embriaguez. (Hanson, 1995). Os que desprezavam o consumo do vinho eram considerados hereges (Austin, 1985).

Na Idade Média houve um grande desenvolvimento da produção de bebidas, sendo o vinho e a cerveja amplamente consumidos especialmente por povos europeus (Viala-Artigues & Mechetti, 2003; Babor, 1986). Durante toda a Idade Média, porém, a evolução mais importante relacionada ao álcool foi a descoberta do processo de destilação, cujo produto era julgado eficiente na cura de doenças (Hanson, 1995). A Peste Negra e as subseqüentes pragas

---

que surgiram em meados do século XIV provocaram um aumento significativo no consumo de bebidas alcoólicas por algumas pessoas, que pensavam que o álcool poderia protegê-las das doenças. Em termos globais, o consumo de álcool aumentou de maneira expressiva nessa época (Viala-Artigues & Mechetti, 2003; Millikan, 1999).

No início do período moderno, apesar do forte impacto exercido pela racionalidade e pela ciência, prevaleceram os ensinamentos da Igreja Católica, que pregava que o álcool foi um presente de Deus, criado para ser utilizado com moderação para obtenção de prazer e saúde, sendo a embriaguez um pecado (Millikan, 1999; Hanson, 1995). A partir desse período até, pelo menos, o início do século XVIII, o ato de beber moderadamente foi reconhecido como de caráter positivo. Houve também um crescimento da preocupação com os efeitos negativos da embriaguez, que era vista como uma ameaça para a salvação espiritual e para o bem-estar social (Viala-Artigues & Mechetti, 2003; Austin, 1985). Porém, nessa época, o consumo de álcool era frequentemente elevado. No século XVI, o consumo de bebidas alcoólicas chegou a 100 litros por pessoa por ano na Espanha e na Polônia. Camponeses chegavam a consumir até três litros de cerveja por dia. Nesse período, surgiram bebidas como o champagne, gin, rum e whiskey e o consumo de destilados foi encorajado por legislação (Braudel, 1974).

Enquanto a embriaguez ainda era aceita como parte do cotidiano no século XVIII (Austin, 1985), o século XIX traria uma mudança de atitudes, como resultado do aumento da industrialização e da necessidade de um trabalho confiável e pontual (Porter, 1990). A embriaguez viria a ser definida como uma ameaça ao desenvolvimento industrial. Ao longo do tempo, cada vez mais problemas de cunho pessoal, social, religioso e moral seriam atribuídos ao uso de álcool, tendo passado a ser inaceitável o consumo de qualquer quantidade de bebida alcoólica. Grupos que antes incentivavam o consumo moderado de álcool tornaram-se estritamente contra o consumo, produção e distribuição de bebidas alcoólicas (Hanson, 1995). A proibição do consumo de álcool falhou em diversos países, cujas populações recorreram ao abastecimento ilegal de álcool. Juntamente à revogação da proibição do consumo, surgiu o reconhecimento do alcoolismo e das doenças associadas ao álcool tais como encefalopatias, cirrose hepática e síndrome alcoólica fetal, e foram criados centros de pesquisa sobre álcool e políticas públicas educacionais visando à prevenção do consumo (Viala-Artigues & Mechetti, 2003; Millikan, 1999).

---

## 1.2 O consumo do álcool e suas conseqüências fisiológicas

O consumo abusivo de substâncias como o álcool e o tabaco é um dos mais consideráveis problemas de saúde no mundo de hoje. Estima-se que os custos à saúde mundial devido ao consumo de álcool sejam similares àqueles atribuídos ao sarampo e à malária (Nelson & Kolls, 2002). Segundo a Organização Mundial de Saúde, em 1990, mais de 750.000 mortes foram atribuídas ao uso de álcool, sendo que 80% dessas ocorreram em países em desenvolvimento. Em 2002, o número de mortes relacionadas ao consumo de álcool subiu para 1, 8 milhões em todo o mundo. Embora já tenham sido demonstrados em vários estudos os efeitos benéficos do consumo moderado de álcool, o consumo de mais de três doses por dia está diretamente associado ao aumento do risco de mortalidade (Nelson & Kolls, 2002; WHO, 2002).

A associação entre a exposição ao álcool e o risco de desenvolver alguma doença relacionada ao mesmo é multifatorial e há uma considerável variação individual, sendo as mulheres particularmente mais susceptíveis ao desenvolvimento de doenças devido à ingestão de álcool. (Díaz, 2002). Fatores associados ao estilo de vida tais como o fumo e o estado geral de saúde podem modificar os efeitos do álcool no organismo (Rimm *et al.*, 1996). Atenção particular deve ser dada à sugestão de que o consumo de álcool de maneira leve a moderada traz benefícios à saúde (Romeo *et al.*, 2007), enquanto que os riscos à saúde se mostram maiores não apenas nos indivíduos que consomem o álcool de maneira indiscriminada, mas também nos que não o consomem. Estudos revelam que são inúmeros os benefícios de um consumo leve a moderado de álcool. Dentre eles, podem-se citar menores taxas de infarto do miocárdio, insuficiência cardíaca e acidente vascular cerebral (AVC) isquêmico e menor risco de desenvolver demência, diabetes e osteoporose. Já o consumo de grandes quantidades de álcool pode afetar negativamente os sistemas neurológico, cardíaco, gastrintestinal, imunológico, hematológico e músculo-esquelético (Standridge *et al.*, 2004).

Estudos epidemiológicos apontam que, comparados a não-consumidores de álcool, indivíduos que consomem de baixas (menos de 2 doses/dia) a moderadas (de 3 a 4 doses/dia) quantidades de álcool apresentam uma diminuição no risco de desenvolver doenças coronarianas, sendo a redução do risco mais acentuada em indivíduos que consomem até duas doses ou 20g diárias. Já indivíduos que consomem grandes quantidades de álcool (mais de 5 doses/dia) apresentam um risco maior de acometimento por doenças coronarianas do que indivíduos não-consumidores de álcool (Room *et al.*, 2005; Rehm *et al.*, 1995; Edwards *et al.*, 1994). Interessantemente, vários estudos confirmando o efeito cardio-protetor dos consumos leve e moderado de álcool, apontam também um risco aumentado de desenvolver as

---

principais doenças coronarianas em consumidores agudos episódicos, ou seja, que consomem grandes quantidades de álcool esporadicamente, em comparação a indivíduos não-consumidores de álcool. Esse padrão irregular de consumo de altas quantidades de álcool parece também estar relacionado a outros problemas cardiovasculares tais como infarto e morte súbita (Murray *et al.*, 2002; McElduff *et al.*, 1997). Há também estudos evidenciando que o consumo de álcool, mesmo que moderado, quando associado a certos fatores genéticos e ambientais, leva a um aumento no risco do desenvolvimento de certos tipos de câncer, tais como de fígado em pacientes com hepatite crônica (Inoue & Seitz, 2001) e de mama nas mulheres (Coutelle *et al.*, 2004).

É importante salientar que os possíveis benefícios do consumo moderado de álcool podem ser alcançados de maneira menos arriscada através da renúncia ao hábito de fumar, de uma dieta pobre em gordura e da prática regular de exercícios físicos. A incidência e a gravidade das conseqüências negativas são proporcionais à quantidade de álcool consumida (Thakker, 1998).

A despeito da variedade de órgãos e sistemas afetados pelo consumo de álcool, o enfoque do presente estudo são os efeitos do consumo agudo de etanol sobre a resposta imune.

### **1.3 Efeitos do álcool sobre o sistema imune**

Estudos das duas últimas décadas têm revelado que o consumo de álcool, seja de forma crônica ou aguda, resulta em alterações em componentes celulares do sistema imune inato e adaptativo (Nelson & Kolls, 2002). A gravidade das alterações no sistema imune depende de diferentes fatores tais como idade, gênero, composição corporal, fatores ambientais, tempo e quantidade de consumo, além do teor alcoólico da bebida. O abuso do álcool é considerado como sendo um fator que interfere na atividade imunológica, causa atrofia do baço e do timo, além de um impacto na redistribuição de leucócitos do sangue periférico devido a uma diminuição da habilidade de migração de leucócitos após injúria ou infecção. Provoca ainda anormalidades funcionais em células *Natural Killer* (NK) e em linfócitos T e B, causando uma diminuição das respostas imunes celular e humoral (Cook, 1998). Dentre as principais alterações no sistema imune, podem-se citar aquelas observadas nas células apresentadoras de antígeno ou APCs (*antigen presenting cells*), que têm seus aspectos fenotípicos e funcionais modificados pela exposição ao álcool. As APCs são componentes especializados do sistema imune inato, que possuem um importante papel na ativação da resposta imune adaptativa, visto que apresentam o antígeno para os linfócitos T,

---

levando à ativação dessa população celular e desencadeando o início de uma resposta imune específica efetiva (Saalmüller, 2006; Delves & Roitt, 2000).

São diversos os efeitos do consumo de álcool sobre células apresentadoras de antígenos encontrados na literatura. De acordo com Szabo e colaboradores (2004), o consumo agudo de álcool (1 dia) resultou em uma diminuição funcional significativa em células dendríticas, que apresentaram uma expressão reduzida das moléculas co-estimuladoras B7.1 e B7.2, bem como uma produção reduzida de IL-12 e aumentada de IL-10. Ainda com relação a alterações em células dendríticas, podemos citar o trabalho de Lau e colaboradores (2006), que demonstraram que a exposição prolongada ao etanol (8 dias) interfere na geração de precursores de células dendríticas mielóides *in vitro*. Interessantemente, Laso e colaboradores (2007) também observaram uma diminuição seletiva da população de células dendríticas mielóides no sangue de pacientes considerados alcoólatras crônicos.

Durante o processo inflamatório em condições infecciosas, fagócitos como neutrófilos e macrófagos têm um papel fundamental em localizar, internalizar e destruir microrganismos que conseguiram se estabelecer em um determinado tecido do corpo (Springer, 1995). Esse processo envolve o recrutamento de células fagocitárias da corrente sanguínea para o local da inflamação, através de uma complexa interação entre fatores solúveis produzidos no local, como componentes do sistema de complemento, citocinas e agentes quimiotáticos como quimiocinas. O uso do álcool pode afetar esse processo de várias maneiras. Sabe-se que a migração de neutrófilos e monócitos da corrente sanguínea envolve aderência ao endotélio vascular e migração para o sítio de infecção, onde ocorrerá a fagocitose do microrganismo e destruição intracelular (Springer, 1995). Em modelo experimental, a ingestão crônica (16 semanas) de álcool em ratos levou a um aumento na expressão da molécula de adesão CD18 em neutrófilos (Bautista, 1997). Foi demonstrado ainda que, no mesmo modelo experimental, as células de Kupffer (macrófagos residentes do fígado) apresentaram uma maior produção da citocina IL-8 e da proteína inflamatória de macrófagos MIP-2, ambas quimiotáticas para neutrófilos (Bautista, 1997). Esses resultados experimentais corroboram com os achados de trabalhos com humanos em que os autores sugerem que o infiltrado de neutrófilos observado em pacientes com hepatite alcoólica estaria relacionado à produção aumentada de IL-8 e MIP-2 no fígado pelas células de Kupffer (Maher, 1995; French, 1996).

Uma função fagocítica deficiente foi demonstrada em monócitos de pacientes com cirrose alcoólica (Silvain *et al.*, 1995). Em humanos, até mesmo a adição aguda (15 minutos a 3 dias) de álcool *in vitro* foi capaz de inibir a função fagocítica, a atividade antimicrobiana e a expressão de receptores Fc $\gamma$  do tipo II, envolvidos na fagocitose de partículas opsonizadas (Morland & Morland, 1989; Zuiable *et al.*, 1992). Em camundongos, tanto a ingestão aguda (4

---

dias) quanto a ingestão crônica (14 dias) de álcool resultaram em uma diminuição da capacidade de fagocitose em macrófagos peritoneais (Castro *et al.*, 1993). Em um outro modelo experimental de alcoolismo crônico (12 semanas), a fagocitose mediada por receptores de Fc e C3b em macrófagos de ratos foi reduzida, apesar de não ter havido uma diminuição no número de receptores de superfície expressos (Bagasra *et al.*, 1988). Assim, alterações na fagocitose realizada por macrófagos após o consumo de álcool podem comprometer a atividade microbicida realizada por essas células.

Além do impacto sobre atividades de células da imunidade inata, vários autores abordam também os efeitos do consumo de álcool sobre populações de linfócitos T. Estudos em modelos experimentais investigando linfócitos e subpopulações de linfócitos têm demonstrado, de maneira geral, uma queda no número dessas células no sangue, independente do tempo de exposição ao álcool. A ingestão crônica (8 dias) de etanol em camundongos resultou em uma diminuição no tamanho e número de células no timo, baço e linfonodos (Jerrels *et al.*, 1990; Pruett *et al.*, 1994). Embora o mecanismo responsável pela queda do número de linfócitos devido ao consumo do etanol ainda não esteja esclarecido, um possível fenômeno explicativo é a morte celular programada ou apoptose. O tratamento agudo (1 dia) com etanol resultou em um aumento na taxa de apoptose de timócitos (Ewald & Shao, 1993). Um aumento da atividade apoptótica também foi observado em células mononucleares do sangue de humanos após consumo agudo (3 dias) de etanol (Szabo *et al.*, 1995). Além de um número reduzido de linfócitos, uma diminuição na proliferação celular também foi observada, o que sugere que linfócitos expostos ao etanol têm capacidade reduzida de se proliferarem e se diferenciarem em resposta a um desafio antigênico (Roselle, 1992; Jerrels & Sibley, 1996). Uma redução no número de linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> foi encontrada após o consumo crônico (1 a 4 semanas) de álcool em ratos (Boyadjieva, 2002). Em contraste, em humanos, um aumento no valor absoluto de células CD3<sup>+</sup> foi recentemente descrito após um consumo moderado de cerveja durante 30 dias (Romeo, 2007). Seria razoável de se imaginar que os efeitos do álcool sobre linfócitos T dependem da quantidade consumida. Entretanto, devem-se considerar outros parâmetros para uma conclusão mais detalhada dessa observação.

Muitas das atividades efectoras de células da imunidade inata e adaptativa são mediadas por citocinas. Estas são proteínas sinalizadoras produzidas fisiologicamente, mas em quantidades aumentadas em resposta a infecções ou danos celulares. O alcoolismo vem sendo associado a uma ruptura no balanço e função de citocinas (Dominguez-Santalla, 2001; Crews, 2006). Concentrações aumentadas de TNF- $\alpha$  e IL-6, bem como uma diminuição nos níveis de IL-10, IFN- $\gamma$  e IL-2 têm sido freqüentemente associadas a pacientes alcoólatras com cirrose (Romeo, 2007). Em contraste, após um consumo moderado de cerveja durante 30 dias, foi

---

mostrado um aumento na produção de IL-2, IL-4 e IL-10 e IFN- $\gamma$  em humanos. Os resultados contrastantes reforçam a importância da quantidade de álcool consumida.

Em suma, o consumo de álcool, seja agudo ou crônico, exerce um considerável impacto sobre aspectos fenotípicos e funcionais de células do sistema imune.

#### **1.4 Aspectos fenotípicos e funcionais de células apresentadoras de antígenos e linfócitos T CD4<sup>+</sup>**

O sistema imune caracteriza-se por uma complexa organização de células e moléculas especializadas. Há fundamentalmente dois tipos de respostas imunes, a inata e a adaptativa. A resposta imune inata é mediada por componentes humorais, como citocinas e fatores do complemento, e por componentes celulares, tais como células NK, granulócitos, macrófagos e células dendríticas. Já a resposta imune adaptativa compreende a atividade de linfócitos B e linfócitos T (Delves & Roitt, 2000).

As APCs, componentes especializados do sistema imune inato, possuem um importante papel na ativação da resposta imune adaptativa, visto que apresentam o antígeno para os linfócitos T, levando à ativação dessa população celular e desencadeando o início de uma resposta imune específica (Saalmüller, 2006; Delves & Roitt, 2000). Dentre as populações de APCs profissionais, podem-se destacar as células dendríticas, os macrófagos e os linfócitos B.

As células dendríticas, conhecidas como as mais eficientes APCs, constituem uma população celular de leucócitos altamente especializada, com alta capacidade de migração e, dessa maneira, com grande probabilidade de entrar em contato com microrganismos invasores e iniciar uma resposta imune T específica (Cools *et al.*, 2007; Mellman, 2005). São encontradas em todos os tecidos linfóides e não-linfóides e nas circulações sanguínea e linfática (McCullough & Summerfield, 2005). Ao contrário de linfócitos B, que são capazes de apresentar uma quantidade limitada de antígenos, as células dendríticas podem apresentar uma quantidade aparentemente ilimitada de antígenos protéicos, derivados de carboidratos e de lipídeos, sendo capazes de estimular linfócitos T virgens e de memória (Mellman, 2005). Interessantemente, o papel das células dendríticas em iniciar uma resposta imune parece ser balanceado pela capacidade dessas células em manter a tolerância periférica a antígenos próprios (Steinman *et al.*, 2000).

Dessa maneira, as células dendríticas possuem a capacidade de direcionar o perfil dos linfócitos T para a imunidade ou para a tolerância, além de possuírem um papel na determinação da diferenciação das células T nos diversos subtipos existentes, tais como Th1,



---

Th2 ou T reguladoras, no momento da estimulação inicial (Mellman, 2005; Shortman *et al.*, 2002; Liu, 2001; Banchereau *et al.*, 2000).

As células dendríticas são originadas de células hematopoéticas da medula óssea, que dão origem a precursores que migram para a corrente sanguínea, bem como para tecidos linfóides e não-linfóides, onde residem como células imaturas (Liu, 2001). Células dendríticas imaturas possuem alta capacidade de endocitose e fagocitose, o que permite uma eficiente captura antigênica, mas expressam baixos níveis de MHC II (*major histocompatibility complex class II*) e de moléculas co-estimuladoras em sua superfície, sendo ainda pouco eficientes na estimulação de linfócitos T (Mellman, 2005). Após infecção microbiana e/ou dano tecidual, células dendríticas imaturas migram para o local da infecção em resposta à produção de quimiocinas inflamatórias e reconhecem padrões moleculares associados a patógenos ou PAMPs (*pathogen associated molecular patterns*) de produtos microbianos por meio de receptores de reconhecimento de padrões ou PRRs (*pattern-recognition receptors*), dentre os quais se destacam os receptores do tipo toll ou TLRs (*toll like receptors*). Após o reconhecimento do patógeno, as células dendríticas passam a liberar grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias, resultando na ativação de células do sistema imune inato e, portanto, limitando a infecção. Ao reconhecerem os PAMPs, as células dendríticas adquirem um fenótipo de células maduras, estando o processo de maturação associado a mudanças como a perda de receptores endocitários e fagocitários, maiores níveis de expressão de moléculas de MHC II na superfície celular, maior produção de moléculas co-estimuladoras e maior capacidade de processamento antigênico. Ao se tornarem maduras, as células dendríticas migram, por via linfática aferente, para as áreas T específicas de linfonodos locais, onde encontram linfócitos T antígeno-específicos e induzem a ativação e diferenciação dessas células em células efetoras, dando início a uma resposta imune primária (Sato & Fujita, 2007; Rossi & Young, 2005).

Pelo menos dois subtipos de células dendríticas foram identificados em camundongos: células dendríticas mielóides e células dendríticas linfóides, também originadas de células precursoras da medula óssea (Banchereau *et al.*, 2000). Células dendríticas mielóides e linfóides diferem quanto ao fenótipo, localização e função. Ambos os tipos expressam altos níveis de CD11c, de MHC II e das moléculas co-estimuladoras CD40 e CD86. Até o momento, os marcadores mais confiáveis para distinguir células dendríticas mielóides de linfóides são CD8 e CD11b. CD8 é expresso pelas células dendríticas linfóides, mas não pelas mielóides. Em contraste, CD11b é expresso pelas células dendríticas mielóides, mas não pelas linfóides (Sato & Fujita, 2007; Liu, 2001). Células dendríticas linfóides estão localizadas em zonas de células T do baço e linfonodos, enquanto as células dendríticas mielóides estão na

---

zona marginal do baço, podendo migrar para zonas de células T sob influência de estímulos microbianos (Shortman *et al.*, 2002; Banchereau *et al.*, 2000). As células dendríticas linfóides produzem altas quantidades da citocina IL-12, que induz a produção de IFN- $\gamma$  e preferencialmente respostas do tipo 1. Possuem ainda menor capacidade fagocítica (Leenen *et al.*, 1998; Pulendran *et al.*, 1997) e são menos eficientes na estimulação *in vitro* de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> do que células dendríticas mielóides, que não possuem a capacidade de produzir grandes quantidades de IL-12, induzindo, preferencialmente, respostas do tipo 2 (Liu, 2001; Banchereau *et al.*, 2000). *In vivo*, células dendríticas mielóides e linfóides parecem ser capazes de estimular linfócitos T CD4<sup>+</sup> de maneira eficiente (Banchereau *et al.*, 2000).

Uma outra importante população de células apresentadoras de antígenos é constituída por macrófagos, que são monócitos emigrantes da corrente sanguínea para os tecidos. Os macrófagos possuem um importante papel na manutenção da homeostase tecidual, sendo responsáveis pelo “*clearance*” de células senescentes e pelo remodelamento e reparo tecidual após inflamação (Gordon & Taylor, 2005). Diferentes funções são adotadas pelos macrófagos de acordo com sua localização anatômica. Como exemplo da heterogeneidade de funções dessa população celular, podem-se citar a habilidade de remodelamento ósseo dos osteoclastos, a alta expressão de PRRs pelos macrófagos alveolares, que estão envolvidos na retirada de microrganismos e partículas ambientais dos pulmões e o “*clearance*” de células apoptóticas geradas no timo após o desenvolvimento de uma resposta imune específica. Os macrófagos também possuem um papel crucial nas respostas imunes a patógenos, sendo mediadores de processos inflamatórios, que são essenciais para a destruição e retirada de microrganismos invasores. Possuem ainda uma função no controle do processo inflamatório por meio da produção de citocinas antiinflamatórias e da eliminação de detritos teciduais (Laskin *et al.*, 2001).

Os macrófagos são derivados de células hematopoéticas da medula óssea. Após um processo de maturação e proliferação dependente de fatores hematopoéticos como o MCSF (*macrophage colony stimulating factor*) e o GMCSF (*granulocyte-macrophage colony stimulating factor*), os monoblastos precursores se desenvolvem em monócitos, que então deixam a medula óssea e entram na corrente sanguínea, circulando por todo o corpo. Os monócitos representam cerca de 5% dos leucócitos circulantes e aproximadamente 24 horas após a entrada na circulação, migram para os tecidos onde se diferenciam em macrófagos. O processo de diferenciação dos monócitos em macrófagos é regulado por características do microambiente e pelo grau de estimulação hematopoética no tecido (Billack, 2006; Morio *et al.*, 2000; Rutherford *et al.*, 1993). Os macrófagos são encontrados em todos os órgãos e

---

tecidos conectivos, havendo populações mais significativas no fígado, pulmões, baço, rins e cérebro (Billack, 2006). O marcador fenotípico mais comumente utilizado para designar a população de macrófagos é a molécula de superfície CD14, sendo também comum o uso dos marcadores CD11b e CD11c para a identificação dessa população celular (Veja & Corbí, 2006; Perera *et al.*, 2001, Lai *et al.*, 1998; Civin & Loken, 1987).

Os linfócitos B, fenotipicamente caracterizados como células CD19<sup>+</sup>/B220<sup>+</sup>, representam aproximadamente 15% dos leucócitos do sangue periférico e são as células responsáveis pela produção de imunoglobulinas antígeno-específicas. Embora sua função primordial seja a produção de imunoglobulinas, os linfócitos B também podem atuar como células apresentadoras de antígenos (Chaplin, 2006; Rumfelt *et al.*, 2006). Como células apresentadoras de antígenos profissionais, podem desviar o perfil dos linfócitos T para a inflamação ou para a tolerância, participando, dessa maneira, da regulação da resposta imunológica (Rodríguez-Pinto, 2006).

Linfócitos B virgens circulam pelo sangue e pela linfa e se dirigem para órgãos linfóides secundários, onde encontram antígenos e linfócitos T antígeno-específicos. Nesses órgãos linfóides secundários, linfócitos B e T estão distribuídos em diferentes áreas, estando os linfócitos B situados em folículos linfóides e os linfócitos T no para-córtex do linfonodo e em bainhas linfóides periarteolares no baço (Crivellato *et al.*, 2004). Quando os antígenos alcançam esses órgãos, são endocitados pelos linfócitos B por meio do BCR (*B cell receptor*), uma imunoglobulina de membrana que se liga com alta afinidade a um determinado antígeno. Vários estudos determinaram que a afinidade da ligação BCR-antígeno é diretamente proporcional à capacidade de apresentação antigênica do linfócito B para o linfócito T. Dessa maneira, os linfócitos B podem internalizar pequenas quantidades de antígeno e apresentá-las de maneira eficiente aos linfócitos T (Rodríguez-Pinto, 2006). A alta afinidade de ligação entre o BCR e o antígeno também pode afetar a região antigênica que vai ser apresentada, sendo bloqueado o epitopo ligado ao BCR, o que resulta na apresentação de outros determinantes antigênicos. Por meio desse mecanismo, os linfócitos B contribuem para a diversificação da resposta imune (Liang & Mamula, 2000). Após se ligar ao BCR, o antígeno é internalizado e o complexo BCR-antígeno é direcionado, por via endocítica, a compartimentos ricos em moléculas de MHC II, onde se forma o complexo MHCII-peptídeo, que é apresentado ao linfócito T nas áreas onde se encontram essas células nos órgãos linfóides (Rodríguez-Pinto, 2006). As células apresentadoras de antígenos, dessa forma, representam um elemento chave no processo de ativação de uma resposta imune adaptativa, que ocorre por meio da apresentação antigênica para linfócitos T, o que leva ao

---

desencadeamento de uma resposta imune específica (Saalmüller, 2006; Delves & Roitt, 2000).

A regulação de uma resposta imune específica, iniciada após o reconhecimento antigênico pela APC, é resultante de uma comunicação entre o receptor de células T ou TCR (*T cell receptor*) e o complexo de histocompatibilidade principal ou MHC (*major histocompatibility complex*) conjugado ao peptídeo nas células apresentadoras de antígenos ou APCs, que interagem a nível molecular através de sítios de contato célula-célula (Friedl *et al.*, 2005; Hedrick *et al.*, 1984; Babbitt *et al.*, 1985). Devido ao fato de o TCR e o complexo MHC-peptídeo estarem na membrana do linfócito T e da APC, respectivamente, o início da resposta imunológica requer uma forte interação molecular entre a célula T e a APC. Essa interação é denominada sinapse imunológica (Dustin, 2002).

O contato entre linfócitos T e o complexo MHC-peptídeo na célula apresentadora de antígenos resulta na ativação de células T através da interação dinâmica de moléculas nas membranas celulares, o que gera os sinais intracelulares necessários à ativação (Stephen *et al.*, 2005).

A ativação de células T virgens envolve um sistema de controle e equilíbrio integrados, sendo que, além da interação TCR-MHC-peptídeo, há outros importantes aspectos nesse contato, como o estado da resposta imune inata na APC. Em resposta a um produto microbiano conservado evolutivamente, como por exemplo, o LPS, a APC pode se tornar ativada, o que leva a um aumento na expressão de diversas moléculas, incluindo o complexo MHC, moléculas de adesão e ligantes para receptores co-estimuladores, como CD80 e CD86 (Tseng *et al.*, 2001).

Para a completa ativação de células T virgens são necessários sinais co-estimuladores gerados a partir da ligação de co-receptores nas células T, como CD28 e, a moléculas acessórias, como B7.1 – CD80 e B7.2 – CD86 nas APCs. A ligação dessas moléculas co-estimuladoras estabiliza a interação entre a célula T e a APC, o que leva à produção da citocina IL-2 e à subsequente proliferação e diferenciação da célula T virgem em uma célula efetora (Dubey & Croft, 1996). O sinal fornecido pela interação entre as moléculas co-estimuladoras das células T e das APCs é de suma importância para o desvio da atividade do linfócito T para uma natureza inflamatória ou para a tolerância (Carreno & Collins, 2002).

Uma vez completamente ativado, o linfócito T passa a expressar proteínas que contribuem para manter ou modificar os sinais co-estimuladores. Como exemplo dessas proteínas, pode-se citar a molécula CD154 ou CD40L, que se liga à molécula CD40 na APC, e essa ligação transmite sinais bidirecionais de ativação para a célula T e para a APC (Grewal *et al.*, 1998; Whitmire *et al.*, 1999).

---

Uma molécula homóloga a CD28, CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte antigen 4*) se liga também a CD80 e CD86, com uma afinidade muito maior. Porém, em contraste a CD28, CTLA-4 age como um contra-regulador da ativação de linfócitos T, inibindo a produção de IL-2 e a expressão de seu receptor (Brunet *et al.*, 1987; Linsley *et al.*, 1994; Collins *et al.*, 2002).

Em um modelo de colite experimental crônica desenvolvido por Liu e colaboradores (2001), a administração de anticorpos anti-B7-1, mas não de anti-B7-2, extinguiu a infiltração leucocitária nos animais e reduziu a produção das citocinas pró-inflamatórias como IL-12 e IFN- $\gamma$  por linfócitos T CD4<sup>+</sup> da lâmina própria do intestino. Em contraste, a administração de anticorpos anti-CTLA-4 levou à deterioração da doença, causando uma inflamação mais severa e uma produção de citocinas pró-inflamatórias aumentada. Ainda, em camundongos geneticamente deficientes para CD28 (CD28<sup>-/-</sup>) não houve indução da inflamação na mucosa intestinal. Esses dados sugerem que a co-estimulação pela interação B7-CD28 é necessária para a indução de células T efectoras e para a manutenção da inflamação da mucosa intestinal, enquanto que a função de células T reguladoras é CD28 independente.

Cabe ressaltar que o desvio do perfil dos linfócitos T para uma atividade inflamatória ou tolerogênica depende ainda de outros fatores tais como a quantidade de antígeno a ser apresentada, a avidéz e do tempo de interação entre a APC e o linfócito T (Goodnow, 1996).

Macrófagos e células dendríticas apresentam diversas atividades como componentes do sistema imune inato, tais como interação com patógenos e indução da resposta imune adaptativa. Os receptores do tipo Toll ou TLRs (*toll-like receptors*) fazem parte de um grupo de receptores de reconhecimento de padrões que se ligam a estruturas microbianas conservadas (McCoy & O'Neill, 2008). Dentre os dez diferentes tipos de TLRs, que são expressos diferencialmente em APCs, TLR4 e TLR2 são expressos na membrana celular em oposição à localização intracelular dos TLRs 3, 7 e 9 (Kopp & Medzhithov, 2003). Desde sua descoberta, tem sido demonstrado que os TLRs estão envolvidos em diversas funções celulares. A ativação da resposta imune inata via TLRs resulta em um aumento na síntese de substâncias antibacterianas, de citocinas pró-inflamatórias, de óxido nítrico, bem como no aumento da intensidade de expressão de moléculas co-estimuladoras e na maturação de células dendríticas, que se tornam mais efetivas na apresentação de antígenos (Takeda & Akira, 2005). TLRs têm ainda um papel na modulação da resposta imune adaptativa e, quando expressos em linfócitos T, podem influenciar diretamente a produção de citocinas e a atividade supressora dessas células (Kabelitz, 2007; Xu *et al.*, 2004).

Após serem ativados pelas APCs, os linfócitos T passam a secretar a citocina IL-2 e a expressar em sua superfície a molécula CD25 ou IL-2R (*interleukin-2 receptor*), um marcador

---

de ativação celular. A partir da interação entre IL-2 e CD25, passa a ocorrer a proliferação dos linfócitos T (Waldmann, 1991). A molécula CD25 é também um marcador de células T reguladoras, uma população de linfócitos T cuja função é regular negativamente as respostas imunes contra antígenos próprios e não-próprios (Yanyan Qu & Yong Zhao, 2007). As células T reguladoras são responsáveis pela supressão das células T auto-reativas que escapam da seleção negativa no timo; mantêm a imunidade intestinal normal contra bactérias entéricas e suprimem os mecanismos efetores das respostas imunes contra patógenos (Toda & Piccirillo, 2006). As células T reguladoras constituem ainda uma das bases de um fenômeno intestinal fisiológico denominado tolerância oral, definido como uma supressão específica de respostas imunes celulares e/ou humorais a antígenos previamente administrados por via oral. A tolerância oral é o fenômeno responsável pela supressão da reatividade imunológica patológica às proteínas da dieta e à microbiota intestinal, que entram em contato diariamente com a mucosa intestinal (Faria & Weiner, 2006; Weiner, 2004; Vaz, 1979).

A supressão da reatividade imunológica envolve ainda outras moléculas como a citocina TGF- $\beta$ . TGF- $\beta$  ativo é uma proteína homodimérica secretada pela célula em uma forma inativa, incapaz de se ligar ao seu receptor específico, pois se encontra ligado a LAP (*latent associated protein*), com o qual forma um complexo inativo. Associada ao LAP está a proteína LTBP (*latent TGF-beta binding protein*), que direciona a forma latente do TGF- $\beta$  para a matriz extracelular. A ativação do TGF- $\beta$  latente ocorre a partir de sua interação com proteínas da matriz extracelular tais como a transglutaminase, processo em que LAP se desligará da molécula de TGF- $\beta$ , deixando seus epítomos livres para se ligarem a seus receptores celulares (Marek *et al.*, 2002; Munger *et al.*, 1997; Khalil, 2001).

Uma resposta imunológica eficaz depende não apenas da existência dos linfócitos T, mas também do processo de migração dessas células para os linfonodos ou tecidos inflamados, onde ocorre o contato com as células apresentadoras de antígenos. Linfócitos T e B virgens recirculam continuamente através do endotélio em direção aos linfonodos, onde permanecem por aproximadamente 24 horas antes de saírem para a circulação linfática e retornarem à corrente sanguínea. Se houver o contato com as células apresentadoras de antígenos, a resposta imune é iniciada (Cyster, 2005; von Andrian & Mempel, 2003). A molécula CD62L é uma selectina e, como tal, participa de eventos iniciais da interação de vários leucócitos com o endotélio vascular. É expressa constitutivamente em linfócitos T em repouso, mas apresenta uma expressão aumentada nessas células após a ativação, sendo usada como um importante marcador inicial de ativação celular (Butcher, 1999).

---

Não obstante a grande diversidade de aspectos fenotípicos e funcionais referentes às células apresentadoras de antígenos e aos linfócitos T foram aqui abordados somente aqueles avaliados no decorrer deste trabalho.

### **1.5 Justificativa e abordagem racional do estudo**

Em estudo recente desenvolvido pelo nosso grupo (Andrade *et al.*, 2006), utilizando-se um modelo de administração intragástrica aguda de etanol, demonstrou-se que o tratamento oral com etanol durante 4 dias consecutivos exerceu um forte impacto sobre o sistema imunológico de camundongos. Foram observadas alterações como níveis aumentados de IL-4 e IFN- $\gamma$  no estômago, alterações sistêmicas como o aumento da síntese de IL-4 e a diminuição da produção de IL-10 por esplenócitos e a refratariedade à indução de tolerância oral, um fenômeno fisiológico e T - dependente que ocorre na superfície da mucosa intestinal e que mantém a regulação da reatividade imunológica inflamatória a antígenos da dieta e da flora autócrina (Faria & Weiner, 2006). Foram ainda observadas alterações na atividade de macrófagos caracterizadas por uma diminuição da produção de citocinas após estímulo *in vitro* e da atividade fagocitária de partículas de zimosan (dados não publicados).

Com base nas alterações imunológicas relacionadas ao consumo de álcool demonstradas por Andrade e por outros autores, acredita-se que os efeitos diretos ou indiretos do consumo agudo de etanol na imuno-regulação estejam afetando a atividade de células apresentadoras de antígenos e a subsequente geração de células T com características reguladoras. Dessa maneira, nossa proposta de trabalho consiste na avaliação de alterações fenotípicas e funcionais em células apresentadoras de antígeno (células dendríticas, macrófagos e linfócitos B) e linfócitos T CD4<sup>+</sup> após a administração intragástrica aguda de etanol. Apesar de existirem muitos dados na literatura abordando o consumo crônico ou moderado de álcool, pouco se fala sobre os efeitos do consumo agudo de etanol sobre características fenotípicas e funcionais de diferentes populações de células apresentadoras de antígenos, o que ressalta uma possível aplicabilidade clínica de nosso trabalho.

---

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar o impacto da administração intragástrica aguda de etanol sobre aspectos fenotípicos e funcionais de células apresentadoras de antígenos e linfócitos T de órgãos linfóides de camundongos C57BL/6.

### 2.2 Objetivos específicos

Para cumprir os objetivos específicos, traçamos os seguintes tópicos de investigação:

**- Caracterizar, no contexto *ex-vivo*, aspectos funcionais de células apresentadoras de antígenos do peritônio de camundongos C57BL/6 após administração intragástrica aguda de etanol.**

- Analisar o perfil de citocinas intracitoplasmáticas em macrófagos peritoneais – IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-4 e IL-10;
- Avaliar a fagocitose de organismos vivos (*Leishmania*-FITC) em macrófagos peritoneais;

**- Caracterizar, no contexto *ex-vivo*, aspectos fenotípicos e funcionais de células apresentadoras de antígenos do baço de camundongos C57BL/6 após administração intragástrica aguda de etanol.**

- Analisar a expressão de TLR2, TLR4, CD40, CD80 e CD86 em células apresentadoras de antígeno esplênicas;
- Avaliar a endocitose de proteínas solúveis (OVA-FITC) em células apresentadoras de antígeno esplênicas;

**- Caracterizar fenotipicamente, através da citometria de fluxo, no contexto *ex-vivo*, a população de linfócitos T CD4<sup>+</sup> do baço de camundongos C57BL/6 após administração intragástrica aguda de etanol.**

- Analisar a expressão dos marcadores de superfície celular CD25, CD62L, TLR2, TLR4 e LAP.



---

## **3 MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1 Animais**

Foram utilizadas, neste trabalho, fêmeas de camundongos da linhagem C57BL/6 com 8-10 semanas, pesando aproximadamente 25 g, fornecidas pelo Biotério de Produção e mantidas no Biotério de Experimentação do Instituto René Rachou (IRR).

### **3.2 Modelo de administração oral de etanol (EtOH)**

Os animais foram suspensos pela base da cauda e retirados da gaiola, sendo rapidamente apoiados sobre a tampa da gaiola em que foram mantidos no biotério de experimentação. A utilização da tampa da gaiola como ponto de apoio para o camundongo favorece ao animal que nela se agarra e nos dá mais firmeza para a realização de contenções posteriores. Utilizando os dedos indicador e polegar, o manipulador imobilizou os animais, segurando-os pela pele da região dorso-cervical. Em seguida, a cauda dos animais foi fixada entre os outros dedos e a palma da mão para limitação total de seus movimentos.

Os animais foram divididos em 2 grupos, sendo Grupo Salina e Grupo EtOH.

Após a contenção, os animais do grupo EtOH foram submetidos a 4 administrações intragástricas de 0,2 mL de etanol 50% (v/v, dose correspondente a 4,5 mg/kg), diluído em salina fisiológica (NaCl 0,15 M) durante 4 dias consecutivos, através de uma agulha de ponta arredondada acoplada a uma seringa de 1ml. Os animais do grupo salina receberam somente salina fisiológica (NaCl 0,15 M) pelo mesmo modelo de administração intragástrica aguda a que foram submetidos os animais do grupo EtOH. Andrade e colaboradores (2006) estabeleceram o tempo de 24 horas após a última administração como o pico do processo de inflamação aguda induzida. Portanto, nesse tempo foram realizadas todas as análises descritas abaixo.

### **3.3 Obtenção e preparo de suspensões celulares**

#### **3.3.1 Suspensão celular enriquecida de macrófagos peritoneais**

Vinte e quatro horas após a última administração de salina ou etanol, os animais receberam uma injeção de 1 mL de tioglicolato 3% no peritônio para o recrutamento de macrófagos para o local. Após 3 dias, deu-se a coleta das células peritoneais como descrito a seguir.

Os animais foram eutanasiados pelo método de deslocamento cervical descrito a seguir. O animal foi apoiado sobre a tampa da gaiola em que foi mantido no biotério de

---

experimentação para que pudesse se agarrar à mesma e proporcionar mais firmeza na realização da eutanásia. O deslocamento cervical consistiu em segurar a cauda do animal com uma das mãos (pela base) e com a outra apoiar uma pinça cirúrgica, ou objeto similar, transversalmente sobre sua região cervical. A seguir, pressionou-se firmemente a pinça para baixo e para frente, empurrando a cabeça do animal, enquanto que, simultaneamente, tracionou-se a cauda em sentido oposto, para trás. Nesse método, a perda total de sensibilidade, devido ao rompimento da medula espinhal, e a morte são imediatos.

Após a realização da eutanásia, em uma bancada de experimentação, o animal foi mergulhado em um béquer contendo álcool 70% e fixado em um suporte (tampa de isopor envolta em papel alumínio) por meio de alfinetes em suas patas. Utilizando-se pinça e tesoura estéreis, a pele do abdome foi cortada de maneira superficial, evitando-se o rompimento do peritônio. O peritônio ficou exposto e foram injetados, com o auxílio de uma seringa, 5 mL de meio RPMI incompleto na cavidade peritoneal. O abdome foi, então, delicadamente massageado para que as células se soltassem da membrana peritoneal. Em seguida, com a mesma seringa utilizada para injetar o RPMI na cavidade peritoneal, a solução injetada foi coletada e transferida para um tubo de poliestireno (FALCON® - BECTON DICKINSON) de 15 mL. O tubo contendo a suspensão celular foi centrifugado a 290 g, 10 minutos, 4°C para lavagem da amostra. A suspensão celular foi ressuspensa por meio de batidas no tubo com o dedo indicador e foi adicionado ao tubo 1 mL de PBS5%SFB (0,15M, pH 7,2). Foi realizada a contagem celular como descrito no item 4. Após a contagem, a concentração celular foi ajustada para  $1 \times 10^7$  céls/ml por meio da adição de PBS5%SFB (0,15M, pH 7,2), quando necessário. A suspensão celular enriquecida de macrófagos foi utilizada em experimentos para análise da atividade de macrófagos, pela citometria de fluxo.

### **3.3.2 Suspensão celular de baço**

Os animais foram eutanasiados pelo método de deslocamento cervical descrito no item anterior. Após a realização da eutanásia, o baço dos animais foi retirado como descrito a seguir. Em capela de fluxo laminar específica para manipulação de animais, o animal foi mergulhado em um béquer contendo álcool 70% e fixado em um suporte (tampa de isopor envolta em papel alumínio) por meio de alfinetes em suas patas. Utilizando-se pinça e tesoura estéreis, a pele do abdome e o peritônio do animal foram cortados, expondo-se seus órgãos abdominais. Com o auxílio da pinça e da tesoura, o baço foi retirado com o mínimo de gordura possível aderida ao mesmo. O baço foi, então, colocado em um tubo cônico de poliestireno de 15 mL

---

(FALCON<sup>®</sup> - BECTON DICKINSON) contendo 5 mL de RPMI 1640 estéril gelado acondicionado em isopor com gelo.

Em seguida, na capela de fluxo laminar do Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração, o baço foi despejado, juntamente com uma pequena quantidade de RPMI (2 mL) do tubo em que estava contido, em um macerador de vidro estéril. O baço foi macerado e a gordura do macerador foi retirada com o auxílio de uma pipeta pasteur estéril. Após a retirada da gordura, o conteúdo do macerador foi despejado no mesmo tubo cônico de poliestireno de 15 mL (FALCON<sup>®</sup> - BECTON DICKINSON) que continha o órgão, havendo, ainda, aproximadamente 3 mL de RPMI 1640 estéril gelado no tubo. Durante todo o procedimento descrito a seguir, os tubos que continham as amostras foram mantidos em um isopor contendo gelo.

Após a maceração dos baços de todos os animais, as amostras armazenadas nos tubos cônicos de poliestireno de 15 mL (FALCON<sup>®</sup> - BECTON DICKINSON) foram submetidas a uma primeira lavagem por centrifugação a 290 g, 10 minutos, 4°C. Após o descarte do sobrenadante, as células foram ressuspensas por meio de batidas no tubo com o dedo indicador e foi realizada a lise das hemácias. Para a lise das hemácias, foram adicionados 9 mL de água estéril e, imediatamente depois, 1 mL de PBS 10 X (0,15M, pH 7,2). Em seguida, a gordura presente na suspensão celular foi retirada com o auxílio de uma pipeta pasteur estéril e seguiu-se nova lavagem por centrifugação a 290 g, 10 minutos, 4°C. Após o descarte do sobrenadante, os leucócitos esplênicos foram ressuspensos por meio de batidas no tubo com o dedo indicador. Foi, então, adicionado a cada tubo, 1 mL de PBS 5%SFB (0,15M, pH 7,2) gelado. Os tubos foram mantidos em isopor contendo gelo para a realização da contagem celular.

### **3.4 Contagem das células viáveis**

Para a diferenciação entre células viáveis e não-viáveis, foi utilizado o corante Azul de Tripiano 0,4%. Uma solução estoque de Azul de Tripiano 0,2% foi preparada em PBS (0,15M, pH 7,2). Para a contagem das células, foram misturados 50 µL da suspensão celular (1:100) em volume igual da solução de Azul de Tripiano 0,2%. A solução foi homogeneizada com o auxílio de uma pipeta. e, utilizando-se a mesma pipeta, retirou-se uma alíquota de aproximadamente 10 µL da solução. Encostando-se a ponta da pipeta na borda da lamínula que cobria a câmara de Neubauer, preencheu-se cuidadosamente a câmara de contagem. Foram contadas as células não-coradas (viáveis) e as coradas (não-viáveis) dos 4 quadrantes externos da câmara de Neubauer, utilizando-se um microscópio óptico no aumento de 400X. O número de células foi calculado pela fórmula:

---

$n^{\circ}$  céls/ml = ( $n^{\circ}$ céls viáveis x diluições utilizadas x  $10^4$ ) /  $n^{\circ}$  quadrantes contados na câmara de Neubauer

A suspensão celular foi ajustada para a concentração de  $1 \times 10^7$  céls/ml.

### **3.5 Detecção de citocinas intracitoplasmáticas em macrófagos peritoneais pela Citometria de Fluxo**

Os ensaios de detecção de citocinas intracitoplasmáticas foram realizados de acordo com o protocolo descrito a seguir. Após a obtenção da suspensão celular peritoneal enriquecida de macrófagos, como descrito no **item 3.1**, 500  $\mu$ L da suspensão celular ( $1,0 \times 10^7$  céls/mL) foram incubados ( $37^{\circ}\text{C}$ , 5% de  $\text{CO}_2$ , 4 horas, sem agitação), em tubos de polipropileno de 5 mL (BECTON DICKINSON), com 1000  $\mu$ l de uma solução contendo o agente estimulador, PMA (*Phorbol Miristate Acetate*, 1 mg/mL) , juntamente com 1  $\mu$ L ionomicina (1mg/mL) e 10  $\mu$ L de brefeldina A (1mg/mL). A utilização de Brefeldina A assegura a retenção das citocinas no interior celular, mantendo a citocina no complexo de Golgi. Para cada tubo, foi realizado um controle sem a adição do estímulo PMA (*Phorbol Miristate Acetate*). Após 4 horas de incubação, foram adicionados à suspensão celular 110  $\mu$ L de EDTA (0,1g/mL, 20mM) e procedeu-se uma incubação por 15 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as células foram lavadas por centrifugação (315 g, 7 minutos,  $4^{\circ}\text{C}$ ), adicionando-se 200  $\mu$ L de PBS-Wash (PBS-W, 15M pH7.4, contendo 0.5% FCS e 0.1% de azida sódica) a cada tubo. O sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas por meio de batidas no tubo com o dedo indicador. As células foram incubadas (30 minutos ao abrigo da luz, a  $4^{\circ}\text{C}$ ) com o anticorpo anti-Mac3-FITC (anti-macrófagos). Em seguida, as amostras foram lavadas por centrifugação (315 g, 7 minutos,  $4^{\circ}\text{C}$ ), adicionando-se 200  $\mu$ L de PBS-Wash (PBS-W, 15M pH7.4, contendo 0.5% FCS e 0.1% de azida sódica) a cada tubo. O sobrenadante desprezado e foi realizada a lise de hemácias adicionando-se a cada tubo, sob agitação no vórtex, 5 ml da solução de lise (Billig 10X pH 7.85). Foi então realizada uma nova lavagem por centrifugação (315 g, 7 minutos,  $4^{\circ}\text{C}$ ), adicionando-se 200  $\mu$ L de PBS-Wash (PBS-W, 15M pH7.4, contendo 0.5% FCS e 0.1% de azida sódica) a cada tubo. Posteriormente, foram adicionados a cada tubo 3 mL de uma solução de PBS contendo 0,5% de saponina (PBS-P), um detergente para fazer a permeabilização da membrana plasmática. Após incubação com PBS-P por 15 minutos à temperatura ambiente, as células foram lavadas por centrifugação (315 g, 7 minutos,  $4^{\circ}\text{C}$ ), adicionando-se 200  $\mu$ L de PBS-Wash (PBS-W, 15M pH 7.4, contendo 0.5% FCS e 0.1% de azida sódica) a cada tubo e seguiu-se a marcação

com os anticorpos anticitocinas. As wells de placas de 96 poços, fundo em U (FALCON® - BECTON DICKINSON), foram adicionados previamente 10 µL dos anticorpos anti-(IL-12, TNF-α, IL-4 e IL-10) marcados com PE de acordo com a diluição padrão estabelecida (Ver tabela 2). Vinte e cinco µL da suspensão celular (marcada com antiMac3) foram então transferidos dos tubos para cada well das placas de 96 poços já contendo os anticorpos anticitocinas, de acordo com o protocolo experimental. Após 30 minutos de incubação a 4°C, ao abrigo da luz, foram realizadas 2 lavagens por centrifugação (315 g, 7 minutos, 4°C), adicionando-se 200 µL de PBS-Wash (PBS-W, 15M pH7.4, contendo 0.5% FCS e 0.1% de azida sódica) e posteriormente 200 µL de PBS-P a cada well. O sobrenadante foi desprezado. As células foram, então, ressuspendidas e fixadas com MFF (10g/L de Paraformaldeído, 1% de Cacodilato de Sódio, 6.67g/L de Cloreto de sódio, pH7.2). As amostras contendo suspensão celular a ser analisada foram transferidas para tubos cônicos de polipropileno de 5 mL (BECTON DICKINSON). A aquisição para leitura dos parâmetros fenotípicos foi realizada em aparelho FACScalibur (BECTON DICKINSON), utilizando ajustes previamente determinados em experimentos de padronização.

Anticorpo	Fluorocromo	Diluição
Anti-IL-4	PE	1:50
Anti-IL-10	PE	1:50
Anti-IL-12(p40/p70)	PE	1:50
Anti-TNF-α	PE	1:50

**Tabela 1** – Diluição padrão de anticorpos utilizados para detecção de citocinas intracitoplasmáticas em macrófagos peritoneais pela citometria de fluxo. Todos os anticorpos utilizados foram produzidos pela BD Biosciences Pharmingen.

### 3.6 Análise da fagocitose de *Leishmania* por macrófagos peritoneais *in vitro*

As *Leishmanias* foram previamente marcadas com FITC da seguinte maneira: 150 µL de uma suspensão de *Leishmanias* contendo  $2 \times 10^7$  parasitos/mL foram incubados com 150 µL de uma solução de FITC na concentração de 200µg/mL em um tubo de polipropileno de 5 mL (BECTON DICKINSON) por 30 minutos a 37°C. Após a incubação, a solução *Leishmanias*-FITC foi lavada por meio de centrifugação a 92 g, 10 minutos, TA, adicionando-se 1,0 mL de PBS (0,15M, pH 7,2) ao tubo. Foram realizadas 3 lavagens consecutivas. Após a última centrifugação, o sobrenadante do tubo foi desprezado e as *Leishmanias*-FITC foram ressuspendidas em 150 µL de PBS (0,15M, pH 7,2) através de batidas no tubo com o dedo indicador. A solução contendo as *Leishmanias*-FITC foi acondicionada em geladeira até o momento da incubação com as células descrita a seguir.

---

Para cada animal, 25  $\mu\text{L}$  ou 50  $\mu\text{L}$  de uma suspensão contendo  $1 \times 10^7$  parasitos/mL - previamente marcados com Isoticianato de Fluoresceína (FITC), diluição 1:2 - dando uma quantidade de 0,25 e 0,5 parasitos por célula, respectivamente, foram colocadas em tubos *ependorffs* de polipropileno em presença de suspensões celulares enriquecidas de macrófagos ( $2 \times 10^6$  céls/mL) obtidas do peritônio (como descrito no **item 3.1**). As células ficaram incubando com as *Leishmanias*-FITC durante 2 horas, sob agitação, em estufa (5%  $\text{CO}_2$ , 37°C). Em seguida, foi realizada uma lavagem por meio de centrifugação 92 g, 10 minutos, TA, o sobrenadante foi desprezado e seguiu-se a marcação com 10  $\mu\text{L}$  de anti-CD14 PE (incubação 30 minutos, ao abrigo da luz). As células foram lavadas por meio de centrifugação a 92 g, 10 minutos, TA. Após a centrifugação, o sobrenadante do tubo foi desprezado e as células foram ressuspensas por meio de batidas no tubo com o dedo indicador e então fixadas com 200  $\mu\text{L}$  de solução fixadora (MFF) para posterior leitura no Citômetro de fluxo.

### **3.7 Análise da endocitose de OVA por APCs *in vitro***

#### **3.7.1 Marcação da proteína Ovalbumina com FITC**

Uma quantidade de 10 mg de Ovalbumina foi diluída em 2 mL de tampão bicarbonato (alíquota do Kit “*Fluoro Tag FITC conjugation – Sigma Immuno Chemicals*”), ficando a proteína na concentração de 5 mg/mL. Para utilização nos experimentos de endocitose, a OVA foi marcada com FITC utilizando-se o Kit “*Fluoro Tag FITC conjugation – Sigma Immuno Chemicals*” como descrito a seguir. A coluna de eluição B de larga escala do Kit foi lavada com 30 mL de PBS (0,15M, pH 7,2). A uma alíquota de 1 mL de OVA na concentração de 5 mg/mL foram adicionados 250  $\mu\text{L}$  de FITC na concentração 10:1 (preparação padronizada pelo kit “*Fluoro Tag FITC conjugation – Sigma Immuno Chemicals*”). A solução OVA-FITC foi incubada por 2 horas à temperatura ambiente no homogeneizador. Em seguida, a solução foi passada pela coluna B de larga escala do Kit, sendo eluída com 30 mL de PBS (0,15M, pH 7,2). Em tubos *ependorffs* de 1,5 mL, foram coletadas porções de 1 mL da solução OVA-FITC. As amostras foram lidas no espectrofotômetro em 280 nm para OVA e 495 nm para FITC, tendo sido selecionadas para concentração aquelas com a relação FITC/OVA mais próxima de 2 (valor recomendado no Kit). As amostras selecionadas foram concentradas através da utilização do sistema *Centricon 30 – Membrana YM-30* e a concentração da solução final foi calculada por meio da relação da

---

soma das razões FITC/OVA dos tubos selecionados e do volume final da solução. A solução final foi armazenada em frasco âmbar na geladeira.

### **3.7.2 Análise da endocitose de OVA-FITC por macrófagos, células dendríticas e linfócitos B esplênicos *in vitro* pela citometria de fluxo**

Para cada animal, 500  $\mu\text{L}$  de uma solução de OVA-FITC na concentração de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  foram acrescentados a um tubo cônico de polipropileno de 5 mL contendo 500  $\mu\text{L}$  de suspensão celular na concentração de  $1,0 \times 10^7$  células/mL. Os tubos foram revestidos com papel alumínio e ficaram incubando no homogeneizador à temperatura ambiente durante 1 hora. Em seguida, realizaram-se duas lavagens com por centrifugação a 290 g, 10 minutos, 4°C com PBS (0,15M, pH 7,2) e posteriormente a marcação com 15  $\mu\text{L}$  anticorpos antimoléculas de superfície para identificar as populações de interesse (anti-CD11c PE, anti-CD14 PE, anti-CD19 PE), em diluições previamente determinadas (incubação por 30 minutos, ao abrigo da luz). As células foram, então, lavadas novamente duas vezes com PBS (0,15M, pH 7,2), ressuspensas através de batidas no tubo com o dedo indicador e fixadas adicionando-se a cada tubo 100  $\mu\text{L}$  da solução fixadora MFF (10g/L de Paraformaldeído, 1% de Cacodilato de Sódio, 6.67g/L de Cloreto de sódio, pH7.2). A leitura das amostras foi realizada no Citômetro de Fluxo, FACScan, em ajustes previamente determinados.

### **3.7.3 Análise da endocitose de OVA-FITC por macrófagos, células dendríticas e linfócitos B esplênicos *in vitro* pela microscopia confocal**

A solução celular utilizada nesta etapa foi a restante da etapa anterior. A um tubo de polipropileno de 5 mL (BECTON DICKINSON), foram acrescentados 50  $\mu\text{L}$  de suspensão celular na concentração de  $1,0 \times 10^7$  células/mL e 2  $\mu\text{L}$  de anticorpo antimoléculas de superfície para identificar as populações de interesse (anti-CD11c PE, anti-CD14 PE, anti-CD19 PE). A solução de células e anticorpos foi incubada durante 30 minutos ao abrigo da luz. Em seguida, foram realizadas duas lavagens por centrifugação a 290 g, 10 minutos, 4°C com 2 mL de PBS Wash (PBS-W, 15M pH7.4, contendo 0.5% FCS e 0.1% de azida sódica) e as células foram fixadas por meio da adição de 80  $\mu\text{L}$  de paraformaldeído 4% ao tubo. Posteriormente, as células foram lavadas por centrifugação a 290 g, 10 minutos, 4°C com 2 mL de PBS Wash (PBS-W, 15M pH7.4, contendo 0.5% FCS e 0.1% de azida sódica) e ressuspensas em 50  $\mu\text{L}$  de PBS 5% SFB.

---

### 3.7.3.1 Preparo das lâminas para análise da endocitose de OVA-FITC por macrófagos, células dendríticas e linfócitos B esplênicos *in vitro* pela microscopia confocal

Lamínulas utilizadas em microscopia confocal foram previamente tratadas com L-poli-Lisina (0,1% em água, SIGMA), substância que medeia a adesão celular à lamínula. As lamínulas foram armazenadas em tubo cônico de polipropileno de 15 mL (FALCON® - BECTON DICKINSON) contendo 10 mL de L-poli-Lisina (0,1% em água, SIGMA) por 24 horas. Posteriormente, as lamínulas foram colocadas em uma câmara úmida (caixa plástica contendo chumaços de algodão molhado), sendo uma lamínula para cada tubo contendo a solução celular preparada no item anterior. A solução celular foi espalhada sobre a lamínula com o auxílio de uma pipeta e procedeu-se uma incubação de 30 minutos. Em seguida, com o auxílio de uma pipeta, o excesso de solução celular sobre as lamínulas foi aspirado e cada lamínula foi colocada sobre uma lâmina contendo uma gota de *mowiol* (uma substância utilizada para conservação da fluorescência empregada na montagem das lâminas de microscopia confocal) com a face à qual as células ficaram aderidas voltada para baixo. As lâminas foram armazenadas em uma caixa ao abrigo da luz na geladeira para posterior visualização no microscópio confocal a laser Zeiss LSM-510.

### 3.8 Imunofenotipagem celular pela Citometria de Fluxo no contexto *ex-vivo*

As reações de imunofluorescência foram realizadas de acordo com protocolo sugerido pela BECTON DICKINSON (San Jose, CA, USA) e adaptado para placas de 96 poços, como descrito a seguir. A cada well da placa de 96 poços fundo em U (FALCON® - BECTON DICKINSON) foram adicionados 25µL da suspensão celular ( $1 \times 10^7$  céls/ml), obtida segundo a descrição feita no **item 3**. Em seguida, foram adicionados a cada well da placa 10 µL da solução de anticorpos monoclonais específicos para as moléculas de interesse, marcados com diferentes fluorocromos, diluídos em tampão PBS 5%SFB (0,15M, pH 7,2), sendo a diluição de cada anticorpo previamente obtida na padronização (ver tabela 1). Para cada teste, foram utilizadas 250.000 células por poço, que ficaram incubando com os anticorpos por 30 min ao abrigo da luz a 4°C. Em seguida, foram realizadas duas lavagens das amostras pela adição de 200µL de PBS-Wash (PBS-W, 15M pH7.4, contendo 0.5% FCS e 0.1% de azida sódica) a cada well, seguidas por centrifugação a 315 g, 7min, 4°C. O sobrenadante foi desprezado e as células ressuspendidas e fixadas em 200µL de solução fixadora MaxFacsFix (MFF- 10g/L de Paraformaldeído, 1% de Cacodilato de Sódio, 6.67g/L de Cloreto de sódio, pH7.2). As amostras, então, foram transferidas para tubos cônicos de poliestireno de 5 mL (BECTON



DICKINSON) e submetidas à leitura no citômetro de fluxo. A aquisição para leitura dos parâmetros fenotípicos foi realizada em aparelho FACScalibur (BECTON DICKINSON), utilizando-se ajustes previamente determinados em experimentos de padronização.

Anticorpo	Fluorocromo	Diluição	Alvo do estudo
Anti-CD3	CY5	1:100	Linfócito T
Anti-CD3	FITC	1:100	Linfócito T
Anti-CD4	FITC	1:100	Linfócito T
Anti-CD4	PE	1:100	Linfócito T
Anti-CD11b	FITC	1:50	Célula dendrítica/Macrófago
Anti-CD11c	PE	1:50	Célula dendrítica
Anti-CD11c	APC	1:50	Célula dendrítica/Macrófago
Anti-CD14	FITC	1:100	Macrófago
Anti-CD14	PE	1:100	Macrófago
Anti-CD19	PE	1:10	Linfócito B
Anti-CD40	PE	1:100	Célula dendrítica/Macrófago
Anti-CD62L	FITC	1:100	Linfócito T
Anti-CD80	PE	1:150	Célula dendrítica/Macrófago
Anti-CD86	PE	1: 50	Célula dendrítica/Macrófago
Anti-LAP	APC	1:50	Linfócito T
Anti-TLR2	FITC	1:100	Linfócito T
Anti-TLR2	PE	1:100	Célula dendrítica/Macrófago
Anti-TLR4	FITC	1:100	Linfócito T
Anti-TLR4	PE	1:100	Célula dendrítica/Macrófago

**Tabela 2** – Diluição padrão de anticorpos para imunofenotipagem celular por citometria de fluxo no contexto ex-vivo. Todos os anticorpos utilizados foram produzidos pela BD Biosciences Pharmingen.

### 3.9 Análise estatística

A análise estatística foi feita através do teste t de *Student* bi-caudal (paramétrico) para computar a diferença significativa ( $p < 0.05$ ) entre os grupos (salina e etanol).

---

## 4 ANÁLISE DOS DADOS OBTIDOS PELA CITOMETRIA DE FLUXO

Os resultados de citometria de fluxo foram analisados utilizando o programa de análise *CellQuest* disponível no Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração do IRR, usando diferentes estratégias, como descrito abaixo:

### 4.1 Identificação fenotípica de células dendríticas

Não é possível identificar as populações de células dendríticas (DCs) simplesmente por características morfométricas, como tamanho e granulosidade, pelo fato delas apresentarem grande diversidade morfológica. Portanto, a identificação foi feita através de características imunofenotípicas.

A enorme variedade de células dendríticas murinas pode ser subdividida em 3 principais subpopulações baseadas na expressão de CD8 $\alpha$ : As DCs CD8 $\alpha^-$  (mielóides) e as DCs CD8 $\alpha^+$  (linfóides) ambas distribuídas nos tecidos linfóides e intersticiais, e as células de *Langherhans* da pele que, depois da sua migração e maturação nos linfonodos, geram uma população de DCs CD8 $\alpha^{\text{int}}$ . As DCs mielóides esplênicas têm sido propostas como importantes na indução de tolerância (Banchereau *et al.*, 2000) e ainda novas subpopulações de DCs com propriedade tolerogênicas tem sido descritas. As DCs mielóides produzem altos níveis de IL-10 e são particularmente capazes de comprometer células T com a produção de IL-10 e IL-4 quando comparadas com as DCs de sítios distantes da mucosa (Iwasaki & Kelsall, 2001). Outro grupo de pesquisadores descreveu uma nova subpopulação de DCs imaturas B220 que expressa baixos níveis de MHC e de moléculas co-estimuladoras, têm capacidade de produzir IFN- $\gamma$  e um potencial baixo de proliferação. Essas DCs possuem a capacidade de induzir a diferenciação de células T reguladoras e capazes de suprimir a proliferação de outros linfócitos T específicos (Martin *et al.*, 2002).

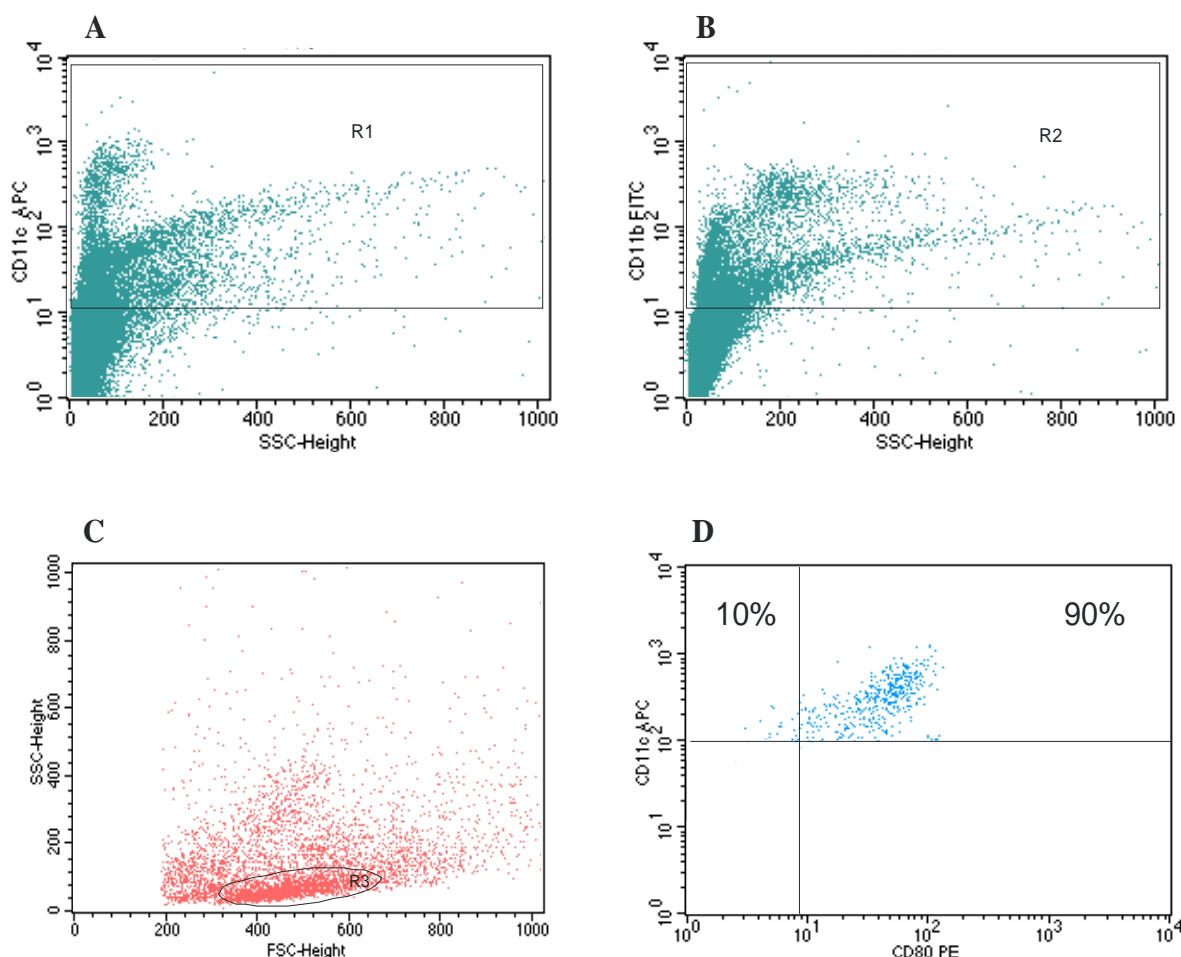
Para a população de **DC mielóides**, que caracterizamos fenotipicamente como CD11c+/CD11b+, construímos um gráfico de distribuição pontual de expressão de CD11c no eixo Y *versus* granulosidade em X (Figura 1 - A). Fizemos um *gate* (R1) na faixa de fluorescência entre  $10^1$  e  $10^4$  para contemplarmos todas as células CD11c positivas.

Em seguida, para o mesmo tubo analisado, construímos um gráfico de distribuição pontual de expressão CD11b *versus* granulosidade (Figura 1 - B) e fizemos um *gate* R2 na faixa de fluorescência entre  $10^1$  e  $10^4$  para contemplarmos todas as células CD11b positivas.

Combinando os *gates* R1 e R2 obtivemos o perfil das células CD11c+/CD11b+ construindo um gráfico (Figura 1 - C) de tamanho (FSC) x granulosidade (SSC). Esse gráfico

foi construído para definirmos nossa população de interesse e por apresentar um perfil mais homogêneo. Escolhemos para o nosso estudo as células com o perfil de tamanho e granulosidade delimitado pelo *gate* R3.

Para análise da ativação celular, verificamos a expressão de moléculas coestimuladoras (CD40, CD80 e CD86) e de receptores do tipo *Toll* (TLR-2 e TLR-4) da seguinte maneira: combinando os *gates* R1, R2 e R3, fizemos um gráfico (Figura 1 - D) de distribuição pontual dos marcadores (CD80 exemplificado no gráfico) dentro da população expressando elevados níveis de CD11c (CD11c<sup>high</sup>). Esse procedimento foi realizado para evitar a contaminação dos resultados pela interferência de outras subpopulações de DCs que expressam níveis intermediários de CD11c, e para garantir que estávamos realmente analisando células dendríticas. Com a análise estatística obtivemos a porcentagem de células em cada quadrante e a intensidade média de fluorescência (IMF) de expressão dos marcadores de ativação, pelos valores da média de deslocamento da população no eixo X (*X mean*).



**Figura 1-** Estratégia de análise de células dendríticas mielóides. Os *Dot plots* obtidos após aquisição e análise dos dados de imunofenotipagem de células dendríticas pela Citometria de Fluxo no programa *CellQuest* representam, em (A) expressão de CD11c x granulosidade (SSC- *Side Scatter*) com *gate* (R1) na faixa de fluorescência entre 10<sup>1</sup> e 10<sup>4</sup>, em (B) expressão CD11b x granulosidade (SSC- *Side Scatter*) com *gate* (R2) na faixa de fluorescência entre 10<sup>1</sup> e 10<sup>4</sup>, em (C) perfil de distribuição de células CD11c+/CD11b+ por tamanho (FSC- *Forward Scatter*) x granulosidade (SSC- *Side Scatter*) com *gate* (R3) para seleção da população com

---

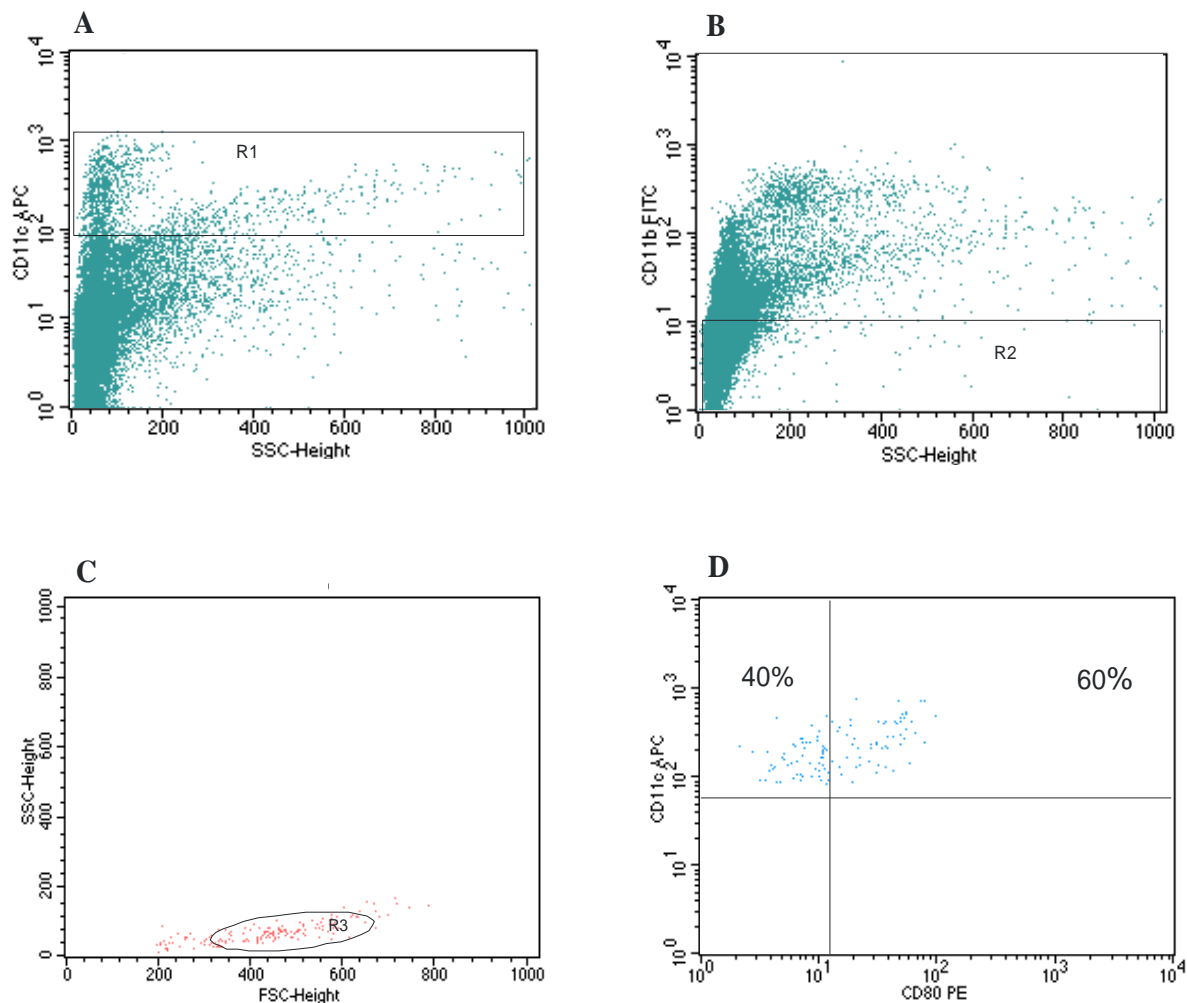
perfil de distribuição homogêneo, em **(D)** expressão de marcadores de ativação celular, exemplificado pelo CD80, na população de células dendríticas mielóides (CD11c x CD80).

Para a população de **DC linfóides**, que caracterizamos fenotipicamente como CD11c<sup>+</sup>/CD11b<sup>-</sup>, construímos um gráfico de distribuição pontual de expressão de CD11c no eixo Y *versus* granulosidade em X (Figura 2 - A). Fizemos um *gate* (R1) na faixa de fluorescência entre  $10^1$  e  $10^3$  para contemplarmos todas as células CD11c positivas.

Em seguida, para o mesmo tubo analisado, construímos um gráfico de distribuição pontual de expressão CD11b x granulosidade (Figura 2 - B) e fizemos um *gate* R2 na faixa de fluorescência entre  $10^0$  e  $10^1$  para pegar as populações CD11b negativas (CD11b<sup>-</sup>).

Novamente combinamos os *gates* R1 e R2 para obtermos um perfil das células CD11c<sup>+</sup>/CD11b<sup>-</sup> em um gráfico (Figura 2 - C) de tamanho (FSC) x granulosidade (SSC). Esse gráfico foi construído para definirmos nossa população de interesse que foi delimitada no *gate* R3, onde observamos que apesar de menos intensa, essa população apresentou as mesmas características morfométricas observadas para DCs mielóides.

Para análise da ativação celular, por exemplo, verificamos a expressão de moléculas co-estimuladoras (CD40, CD80 e CD86) e de receptores do tipo *Toll* (TLR-2 e TLR-4) da seguinte maneira: combinando os *gates* R1, R2 e R3, fizemos um gráfico (Figura 2 - D) de distribuição pontual dos marcadores (CD80 exemplificado no gráfico) dentro da população CD11c<sup>+</sup>. Com a análise estatística obtivemos a porcentagem de células em cada quadrante e a intensidade média de fluorescência (IMF) de expressão dos marcadores de ativação, pelos valores da média de deslocamento da população no eixo X (*X mean*).



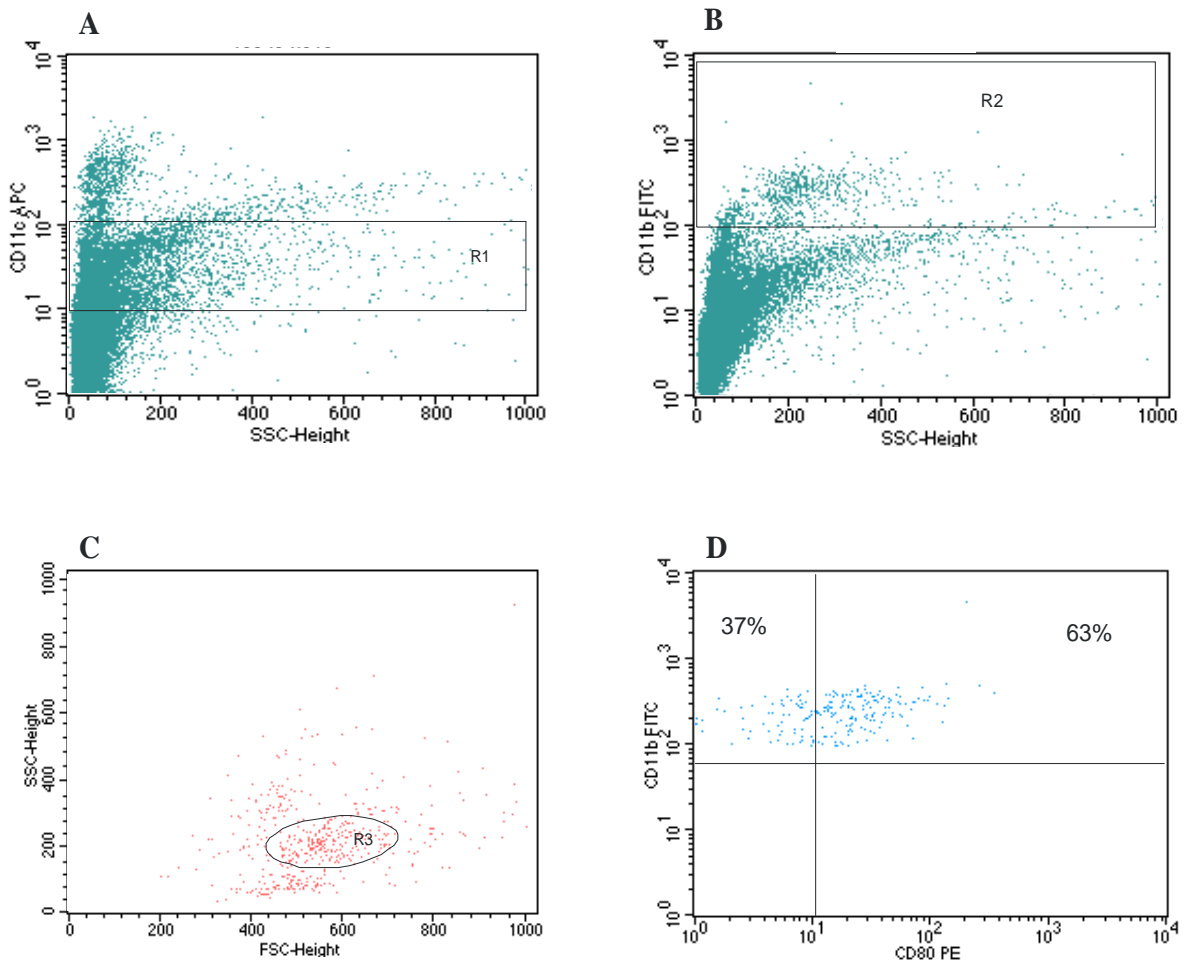
**Figura 2** - Estratégia de análise de células dendríticas linfóides. Os *Dots plots* obtidos após aquisição e análise dos dados de imunofenotipagem de células dendríticas pela Citometria de Fluxo no programa *CellQuest* representam, em (A) expressão de CD11c x granulosidade (SSC- *Side Scatter*) com *gate* (R1) na faixa de fluorescência entre  $10^1$  e  $10^3$ , em (B) expressão CD11b x granulosidade (SSC- *Side Scatter*) com *gate* (R2) na faixa de fluorescência entre  $10^0$  e  $10^1$ , em (C) perfil de distribuição de células CD11c+/CD11b- por tamanho (FSC- *Forward Scatter*) x granulosidade (SSC- *Side Scatter*) com *gate* (R3) para seleção da população com perfil de distribuição homogêneo, em (D) expressão de marcadores de ativação celular, exemplificado pelo CD80, na população de células dendríticas mielóides (CD11c x CD80).

## 4.2 Identificação fenotípica de macrófagos

Para a população de **macrófagos**, que caracterizamos fenotipicamente como CD11c<sup>low</sup>/CD11b<sup>high</sup>, construímos um gráfico de distribuição pontual de expressão de CD11c no eixo Y *versus* granulosidade em X (Figura 3 - A). Fizemos um *gate* (R1) na faixa de fluorescência entre  $10^1$  e  $10^2$  para pegar as células expressam baixos níveis do receptor CD11c. Em seguida, para o mesmo tubo analisado, construímos um gráfico de distribuição pontual de expressão de CD11b no eixo Y x granulosidade em X (Figura 3 - B). Fizemos um *gate* (R2) na faixa de fluorescência entre  $10^2$  e  $10^4$  para contemplarmos as células que expressam níveis elevados do receptor CD11b.

Combinando os *gates* R1 e R2 obtivemos o perfil das células CD11c<sup>low</sup>/CD11b<sup>high</sup> construindo um gráfico (Figura 3 - C) de tamanho (FSC) x granulosidade (SSC). Esse gráfico foi construído para definirmos nossa população de interesse e por apresentar um perfil mais homogêneo, escolhemos para o nosso estudo as células com o perfil de tamanho e granulosidade delimitado pelo *gate* R3.

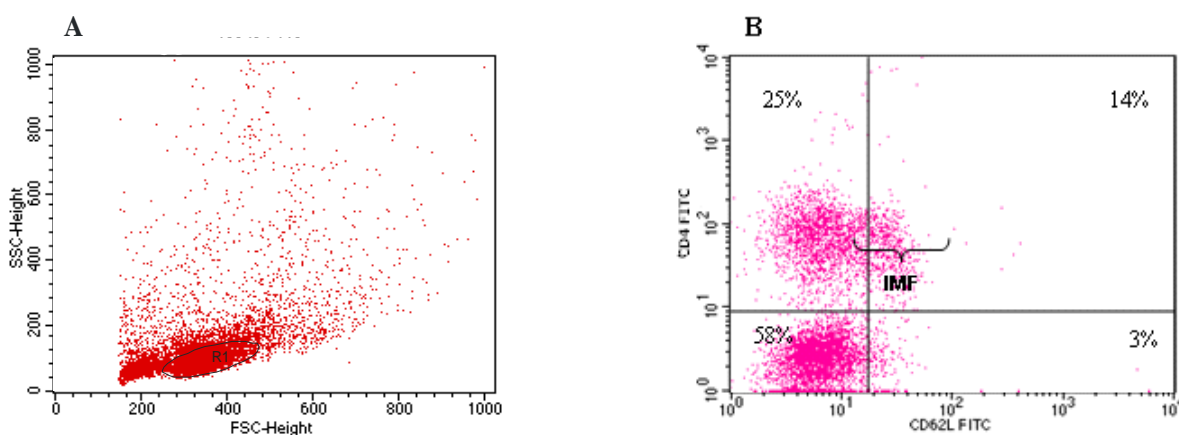
Para análise da ativação celular, verificamos a expressão de moléculas co-estimuladoras (CD40, CD80 e CD86) e de receptores do tipo *Toll* (TLR-2 e TLR-4) da seguinte maneira: combinando os *gates* R1, R2 e R3, fizemos um gráfico (Figura 3 - D) de distribuição pontual dos marcadores (CD80 exemplificado no gráfico) dentro da população CD11b<sup>+</sup>. Com a análise estatística obtivemos a porcentagem de células em cada quadrante e a intensidade média de fluorescência (IMF) de expressão dos marcadores de ativação, pelos valores da média de deslocamento da população no eixo X (*X mean*).



**Figura 3-** Estratégia de análise de macrófagos. Os *Dots plots* obtidos após aquisição e análise dos dados de imunofenotipagem de células dendríticas pela Citometria de Fluxo no programa *CellQuest* representam, em (A) expressão de CD11c x granulosidade (SSC- *Side Scatter*) com *gate* (R1) na faixa de fluorescência entre 10<sup>1</sup> e 10<sup>2</sup>, em (B) expressão CD11b x granulosidade (SSC- *Side Scatter*) com *gate* (R2) na faixa de fluorescência entre 10<sup>2</sup> e 10<sup>4</sup>, em (C) perfil de distribuição de células CD11c<sup>low</sup>/CD11b<sup>high</sup> por tamanho (FSC- *Forward Scatter*) x granulosidade (SSC- *Side Scatter*) com *gate* (R3) para seleção da população com perfil de distribuição homogêneo, em (D) expressão de marcadores de ativação celular, exemplificado pelo CD80, na população de macrófagos (CD11b x CD80).

### 4.3 Identificação fenotípica de linfócitos

De acordo com suas características morfométricas, linfócitos podem ser diferenciados de outras populações celulares por localizarem em uma determinada faixa de tamanho (FSC=200-400). Desta forma, todas as análises de linfócitos foram feitas selecionando-se a população de interesse (*gate* R1) através do seu perfil de SSC x FSC, como demonstrado na figura 4 - A. Para uma caracterização imunofenotípica, analisamos a porcentagem de células e a intensidade de expressão de várias moléculas de superfície expressas em linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Para a expressão de CTLA-4, TLR-4, LAP, LFA-1, CD69, CD25 e CD45 realizamos uma estratégia de análise convencional onde foi construído um gráfico (Figura 4 - B) de distribuição pontual dos marcadores CD4 em Y (FL1) *versus* CD62L (por exemplo) em X (FL2), selecionado dentro da população delimitada no *gate* R1. Com a análise estatística obtivemos a porcentagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup> expressando CD62L (UR), além da intensidade média de fluorescência (IMF) de expressão de CD62L, pelos valores da média de deslocamento da população no eixo X (*X mean*).



**Figura 4** - Estratégia de análise convencional para identificação de marcadores imunofenotípicos em linfócitos T. Os *Dot plots* obtidos após aquisição e análise dos dados de imunofenotipagem de células dendríticas pela Citometria de Fluxo no programa *CellQuest* representam, em (A) tamanho (FSC- *Forward Scatter*) x granulosidade (SSC- *Side Scatter*) com *gate* (R1) na faixa de tamanho entre 200-400, e em (B) expressão de CD4 (FL1) x CD62L (FL2). IMF= intensidade média de fluorescência.

---

## 5 RESULTADOS

Apresentaremos resultados sobre os efeitos da administração intragástrica aguda de etanol sobre características fenotípicas e funcionais de células apresentadoras de antígenos e linfócitos T.

### 5.1 Estudo das alterações funcionais em células apresentadoras de antígenos peritoneais após a administração intragástrica aguda de etanol

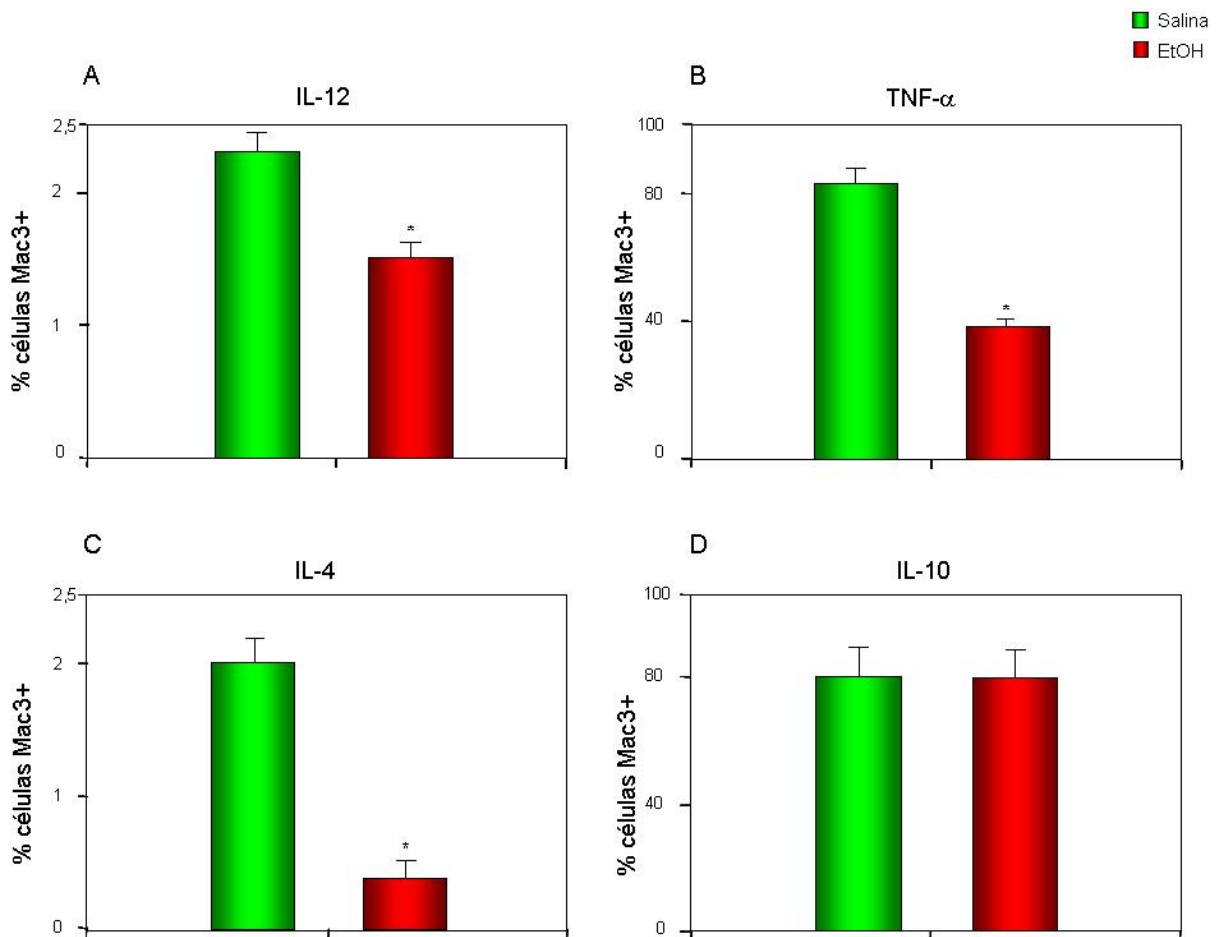
Macrófagos, que constituem uma importante população de células apresentadoras de antígenos já sabidamente sensíveis ao efeito do álcool, foram inicialmente avaliados em nosso estudo. A escolha do peritônio deveu-se à facilidade de obtenção de uma maior quantidade de macrófagos que podem facilmente ser recrutado para o local através do uso de tioglicolato.

Neste bloco de resultados avaliamos alterações funcionais em macrófagos peritoneais após a administração intragástrica aguda de etanol.

Inicialmente analisamos, pela citometria de fluxo, a produção de citocinas por macrófagos peritoneais estimulados com PMA (*Phorbol Myristate Acetate*) *in vitro*.

A figura 5 mostra que houve uma redução no percentual de macrófagos produtores de IL-12 (A), TNF- $\alpha$  (B) e IL-4 (C) no grupo tratado com etanol em comparação com o grupo tratado com salina. No entanto, não houve diferença entre os grupos em relação ao percentual de macrófagos produtores de IL-10 (D).





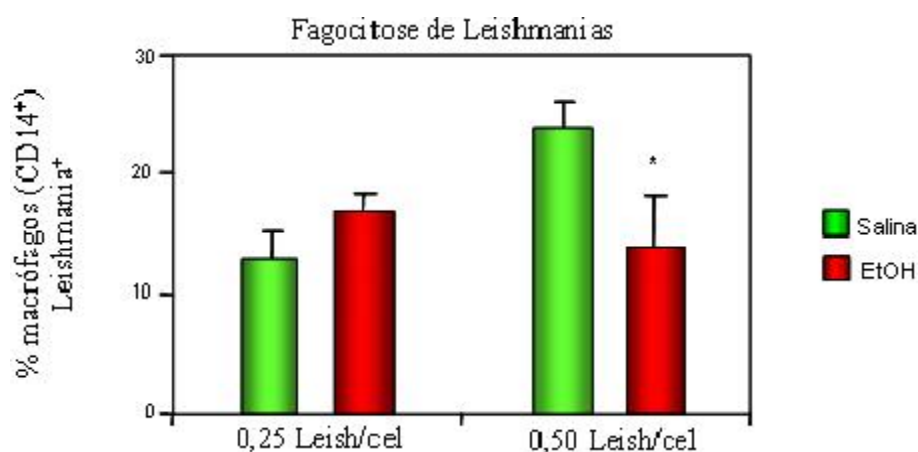
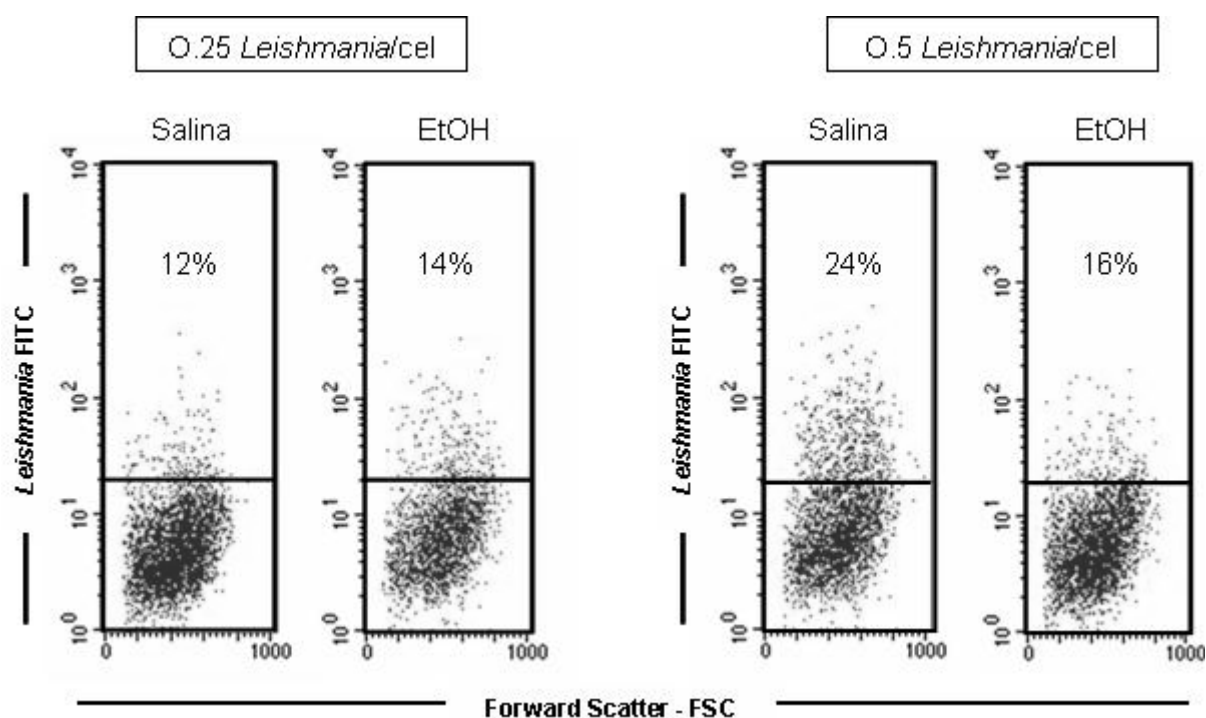
**Figura 5** - Análise da produção de IL-12 (A), TNF- $\alpha$  (B), IL-4 (C) e IL-10 (D) por macrófagos peritoneais após estimulação *in vitro*. Camundongos C57BL/6 receberam, 24 horas após a última administração oral de salina ou etanol (EtOH), uma injeção intraperitoneal com tioglicolato 3%. Após três dias foi feita a coleta de células da cavidade peritoneal. A suspensão celular enriquecida de macrófagos (500  $\mu$ L) foi incubada durante 4 horas (estufa CO<sub>2</sub>, 37 graus, sem agitação) com 500  $\mu$ L de uma solução contendo PMA, ionomicina e brefeldina. Posteriormente, as células foram marcadas com anti-Mac3FITC (incubação por 30 minutos, ao abrigo da luz). Após lavagem e lise das hemácias, procedeu-se uma lavagem com PBS-P e em seguida a marcação com os anticorpos anti-IL-12PE, anti-TNF- $\alpha$ PE, anti-IL-4PE e anti-IL-10PE. As células ficaram incubando durante 30 minutos à temperatura ambiente (ao abrigo da luz). Após esse tempo as células foram lavadas e foi adicionada a solução fixadora (MFF). Foi realizada a aquisição das amostras em Citômetro de fluxo (FACScalibur), usando ajustes (*settings*) previamente padronizados. Em seguida foi realizada a análise dos dados no programa *CellQuest*, e os valores estatísticos obtidos, relacionados com a porcentagem de macrófagos positivos para IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-4 e IL-10, foram tabulados e os resultados expressos graficamente. Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão (EP) do percentual de células duplo-positivas obtidas no *gate* de macrófagos em cada grupo (n=5). Foi realizada a análise estatística através do teste T de *Student* bi-caudal. \*p<0.05.

Nosso próximo objetivo foi continuar analisando aspectos funcionais dessas células através da avaliação de uma atividade primordial para a função de apresentação de antígenos realizada por APCs em contexto patológico, caracterizada pela internalização de organismos vivos, a fagocitose.

Para análise da fagocitose, pela citometria de fluxo, macrófagos peritoneais foram incubados com *Leishmanias* previamente marcadas com o fluorocromo FITC (Isoticianato de Fluoresceína). Na figura 6 - A observamos que com um número menor de *Leishmania* por

---

célula (0,25 Leish/célula), não houve variação no percentual de macrófagos Leish-FITC entre os grupos. Entretanto, ao serem colocados na presença de uma quantidade maior de parasitos por célula (0,5 Leish/célula), observamos uma diminuição na eficiência da fagocitose realizada por macrófagos de animais tratados com etanol quando comparados com macrófagos dos animais do grupo tratado com salina. A título de complementação, a figura 6 - B mostra os *Dot plots* da análise de fagocitose de *Leishmania*-FITC ressaltando a diferença percentual demonstrada nos resultados da figura 6 - A.

**A****B**

**Figura 6 - A** - Análise da fagocitose (*in vitro*) de Leishmanias por macrófagos peritoneais através da citometria de fluxo. Camundongos receberam, 24 horas após a última administração oral de salina ou etanol (EtOH), uma injeção intraperitoneal com tioglicolato 3%. Três dias após foi feita a coleta de células da cavidade peritoneal. Essa suspensão celular enriquecida de macrófagos ficou incubando durante 2 horas (estufa CO<sub>2</sub>, 37 graus, sob agitação) com *Leishmanias* previamente marcadas com FITC. Após esse tempo foi realizada a lavagem para retirar as *Leishmanias* não fagocitadas. Em seguida foi realizada a marcação de macrófagos com anti-CD14PE (incubação 30 minutos, temperatura ambiente). Após esse tempo as células foram lavadas e adicionada a solução fixadora (MFF). Foi realizada a aquisição das amostras em Citômetro de fluxo (FACS Calibur), usando ajustes (*settings*) previamente padronizados. Em seguida foi realizada a análise dos dados no programa *CellQuest*, e os valores estatísticos obtidos no quadrante de células duplo-marcadas foram tabulados e os resultados expressos graficamente. Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão (EP) do percentual de células duplo-marcadas no *gate* de monócitos em cada grupo (n=5). Foi realizada a análise estatística através do teste T de *Student* bi-caudal. \* representa diferença estatisticamente significativa (p<0.05). **B** - *Dot Plots* da análise da fagocitose (*in vitro*) de *Leishmanias* por macrófagos peritoneais através da citometria de fluxo.

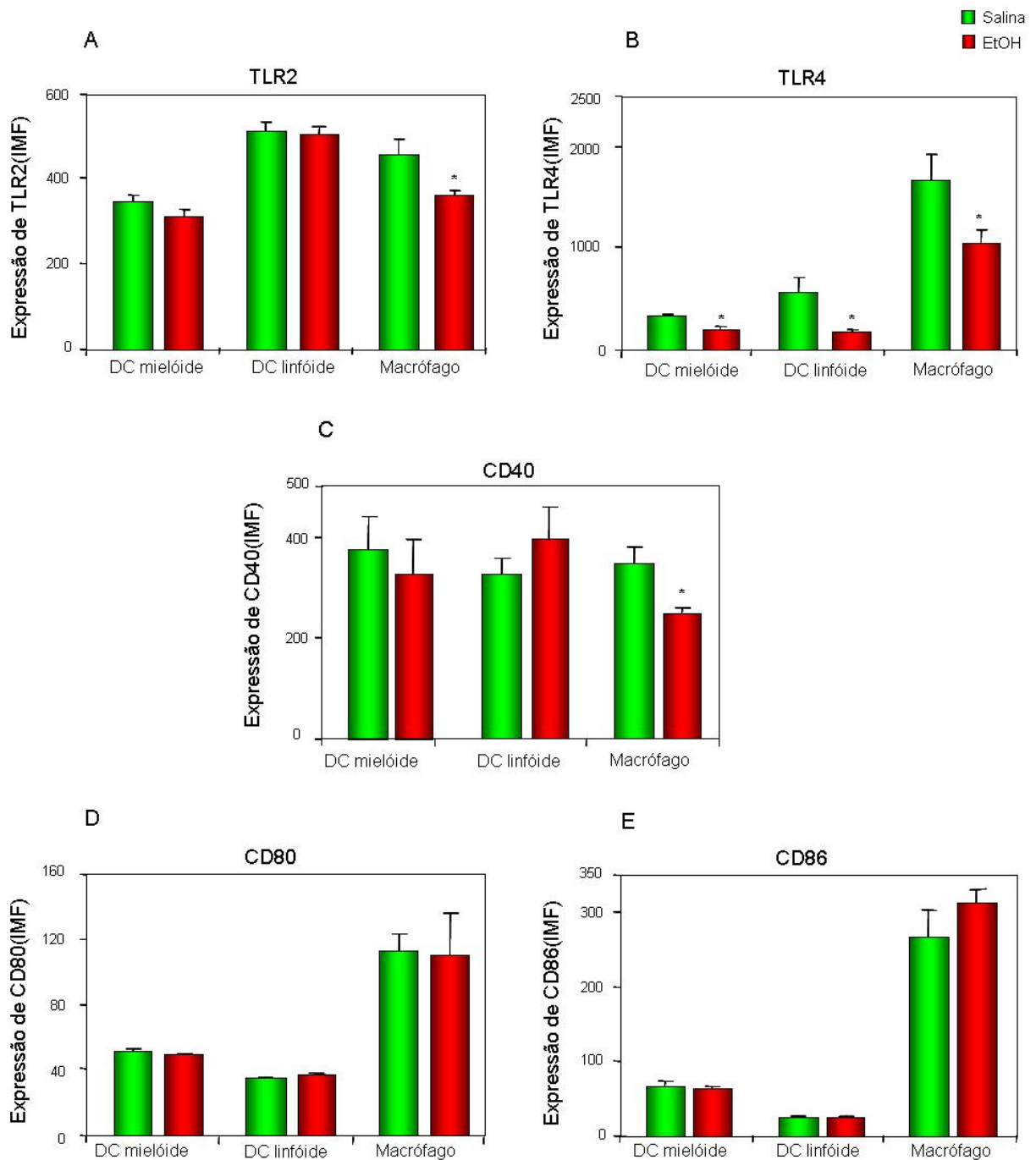
---

Considerando as limitações inerentes ao processo de recrutamento celular para o peritônio, uma vez que os macrófagos foram submetidos a uma pré-ativação pelo uso do tioglicolato, bem como o impacto sistêmico da administração intragástrica aguda de etanol, e visando ampliar a gama de populações celulares analisadas, resolvemos analisar outro compartimento linfóide, o baço, local onde ocorre uma maior diversidade de células apresentadoras de antígenos, nos dando também a possibilidade de trabalharmos em um contexto *ex-vivo*. Cabe ressaltar que no próximo bloco de resultados trabalharemos, portanto, com uma diversidade maior de APCs esplênicas, englobando, além dos macrófagos, células dendríticas das sub-populações linfóide e mielóide.

## **5.2 Estudo das alterações fenotípicas e funcionais em células apresentadoras de antígenos esplênicas após a administração intragástrica aguda de etanol**

Receptores do tipo *Toll* (TLR- *Toll-Like Receptors*) são importantes moléculas envolvidas no reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos ou produtos derivados de patógenos por células apresentadoras de antígenos (McCoy & O'Neill, 2008). Após o reconhecimento e processamento antigênicos, são necessários sinais co-estimuladores para a completa ativação de células T virgens, sendo esses sinais fornecidos por moléculas co-estimuladoras expressas pelas APCs durante a apresentação de antígenos (Dubey & Croft, 1996).

Dessa maneira, nosso próximo objetivo foi avaliar a expressão de TLRs e moléculas co-estimuladoras em APCs esplênicas. Na figura 7, observamos uma redução na intensidade de expressão de TLR-2 (A) em macrófagos do grupo tratado com etanol em relação ao grupo tratado com salina. Na avaliação de TLR4 (B), notamos que em todas as populações de APCs analisadas houve uma redução significativa na intensidade de expressão dessa molécula no grupo tratado com etanol em relação ao grupo tratado com salina. Em relação às moléculas co-estimuladoras, a figura 7 mostra a avaliação da intensidade de expressão de CD80, CD86 e CD40, representadas pelas letras C, D e E, respectivamente, nas populações de APCs esplênicas. Em relação à análise da intensidade de expressão da molécula CD40, observamos uma redução na intensidade de expressão (IMF – Intensidade Média de Fluorescência) dessa molécula somente na superfície de macrófagos do grupo tratado com etanol em relação ao grupo tratado. Não observamos diferença significativa na expressão das moléculas CD80 e CD86 entre os grupos em nenhuma população de APC analisada.



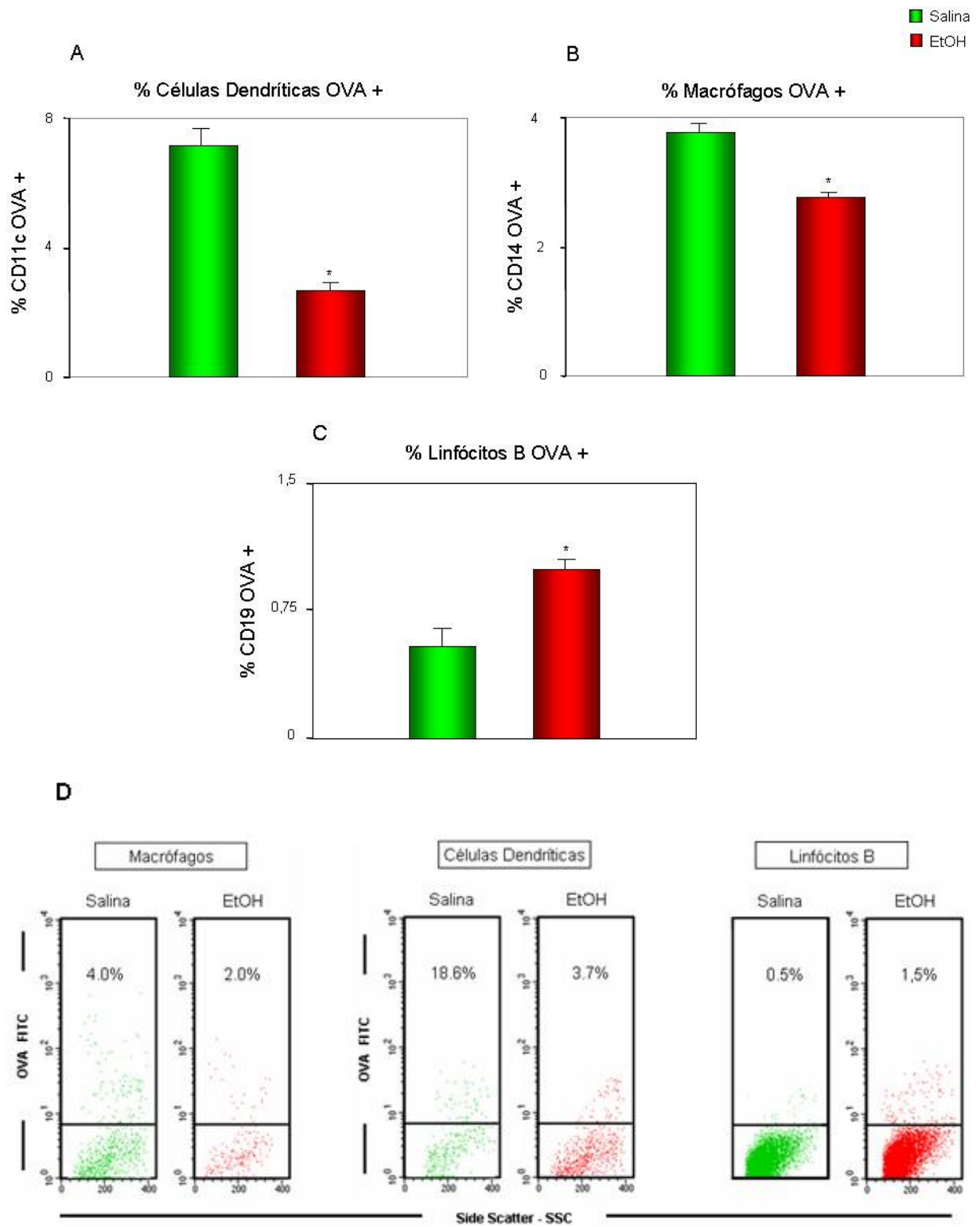
**Figura 7** - Análise da intensidade média de fluorescência (IMF) das moléculas TLR-2 (A), TLR-4 (B), CD40 (C), CD80 (D) e CD86 (E) em populações de APCs no baço. O baço de animais C57BL/6 foi retirado, 24 horas após a última administração oral de salina ou etanol (EtOH), as células coletadas e incubadas (30 minutos, ao abrigo da luz) com anticorpos monoclonais anti-CD11cAPC, anti-CD11bFITC juntamente com anti-TLR-2PE, anti-TLR-4PE, anti-CD40PE, anti-CD80PE e anti-CD86PE. Após adição da solução fixadora (MFF), foi realizada a aquisição das amostras em Citômetro de fluxo (FACScalibur), usando ajustes (*settings*) previamente padronizados. Em seguida foi realizada a análise dos dados no programa *CellQuest*, e os valores foram tabulados. Os resultados representam a intensidade média de fluorescência da expressão de TLR-2, TLR-4, CD40, CD80 e CD86  $\pm$  erro padrão (EP) em cada população celular. Os experimentos foram realizados com 5 animais por grupo. Foi realizada a análise estatística através do teste T de *Student* bi-caudal. \* $p < 0.05$ .

Após avaliarmos alterações fenotípicas em APCs esplênicas através da análise da expressão de moléculas de superfície, foi de nosso interesse avaliar um importante aspecto

---

funcional dessas células, caracterizado pela capacidade de endocitose, processo, tal como a fagocitose, primordial para a função de apresentação de antígenos por APCs.

Para avaliação da endocitose de proteínas solúveis, utilizamos uma proteína da clara do ovo, ovalbumina (OVA), que também foi previamente marcada com FITC através do kit *FluoroTag FITC – conjugation – Sigma Immuno Chemicals (FITC 1)*. Resumidamente, esplenócitos foram incubados com OVA-FITC e posteriormente foi realizada a incubação com anticorpos antimoléculas de superfície, marcados com PE (Ficoeritrina), para identificação das populações de APCs de interesse no estudo. A figura 8 mostra que o percentual de macrófagos (A) e células dendríticas (B) OVA-FITC<sup>+</sup> foi significativamente menor no grupo tratado com etanol em comparação com o grupo tratado com salina. Ao contrário, a análise de linfócitos B (C), uma outra importante população de APC, demonstrou um maior percentual de linfócitos B OVA-FITC<sup>+</sup> no grupo tratado com etanol quando comparado com o grupo tratado com salina. A figura 8 - D mostra os *Dot plots* da análise de endocitose de OVA-FITC ressaltando a diferença percentual demonstrada nos resultados da figura 8 (A-C).

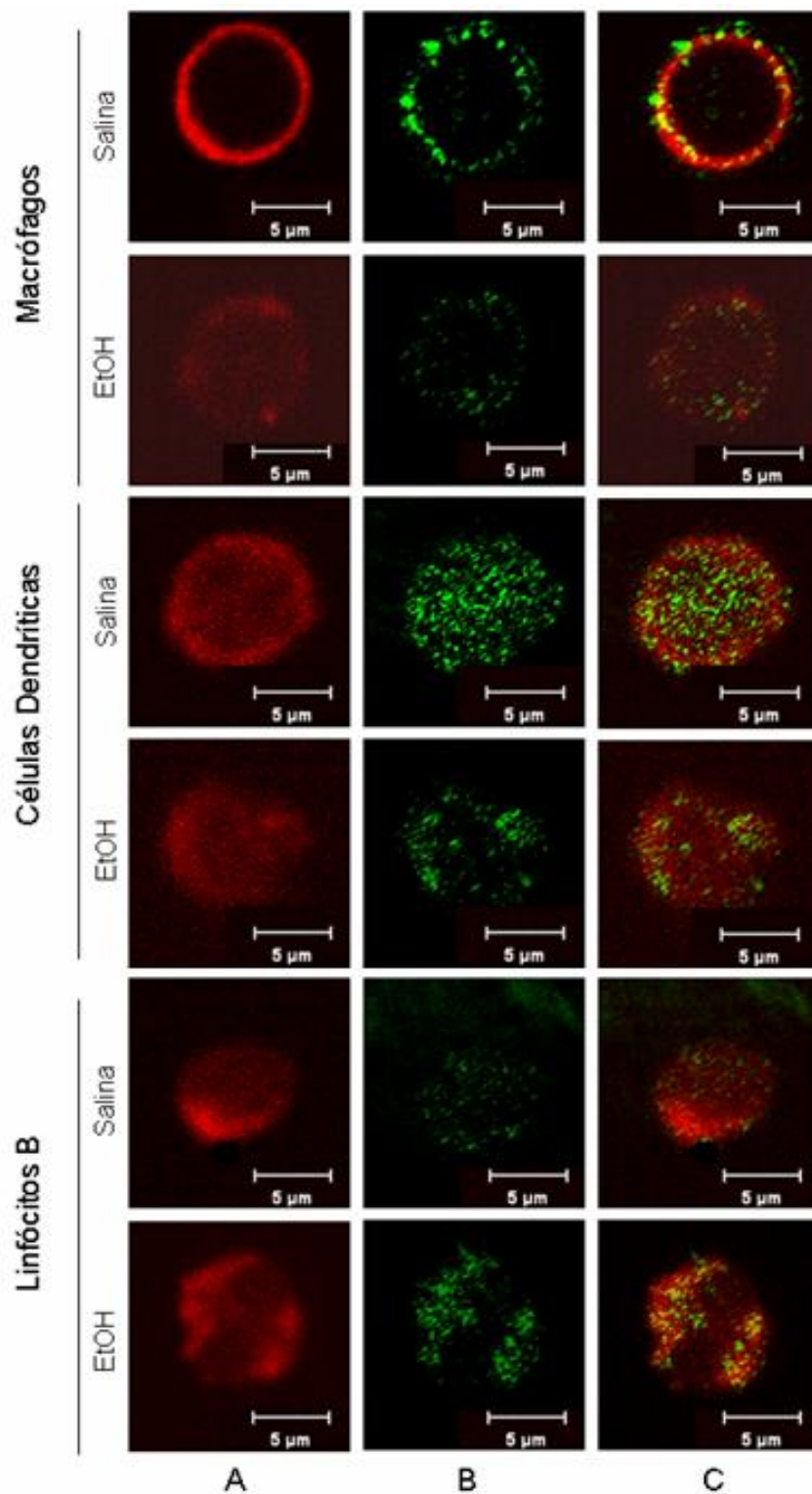


**Figura 8** - Análise da endocitose (in vitro) de OVA por macrófagos (A), células dendríticas esplênicas (B) e linfócitos B (C) através da citometria de fluxo. O baço de animais C57BL/6 foi retirado, 24 horas após a última administração oral de salina ou etanol (EtOH), as células foram coletadas e incubadas (1 hora ao abrigo da luz no homogeneizador) com uma solução de OVA-FITC. Em seguida, procederam-se duas lavagens para retirada da OVA-FITC livre, não endocitada. Posteriormente, as células foram lavadas e incubadas com o anticorpo anti-CD14PE ou anti-CD11cPE ou anti-CD19PE por 30 minutos ao abrigo da luz. As células foram, então, lavadas novamente e fixadas com MFF. Foi realizada a aquisição das amostras em Citômetro de fluxo (FACScalibur), usando ajustes (*settings*) previamente padronizados. Em seguida foi realizada a análise dos dados no programa *CellQuest*, e os valores estatísticos obtidos no quadrante de células duplo-marcadas foram tabulados e os resultados expressos graficamente. Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão (EP) da porcentagem de células duplo-marcadas no *gate* de monócitos em cada grupo (n=3). Foi realizada a análise estatística através do teste T de *Student* bi-caudal. \* representa diferença estatisticamente significativa ( $p < 0.05$ ). A título de complementação, a figura 4 (D) mostra os *Dot plots* da análise de endocitose (in vitro) de OVA-FITC ressaltando a diferença percentual demonstrada nos resultados das letras A, B e C.

---

Uma outra forma de avaliação da endocitose de OVA por APCs foi realizada utilizando a técnica da microscopia confocal, em um experimento complementar ao da citometria de fluxo. Resumidamente, as APCs esplênicas foram incubadas com uma solução de OVA-FITC na concentração de 100µg/mL por 1 hora. Posteriormente as células foram lavadas e incubadas com os anticorpos antimoléculas de superfície CD14, CD11c e CD19, marcados com PE, por meia hora. As células foram, então, lavadas novamente e fixadas para o preparo das lâminas de microscopia confocal. De forma bastante interessante, confirmando os resultados obtidos na avaliação da endocitose pela citometria de fluxo, as imagens da figura 9 mostram que macrófagos e células dendríticas de animais tratados com etanol apresentam menor intensidade de OVA-FITC quando comparado com animais tratados com salina. Entretanto, novamente observamos que os linfócitos B apresentam uma maior intensidade de OVA-FITC, indicando uma maior eficiência da endocitose por essa população de APC.





**Figura 9.** Imagem confocal de APCs incubadas com OVA-FITC. APCs esplênicas foram incubadas com uma solução de OVA-FITC na concentração de 100µg/mL por 1 hora. Posteriormente as células foram lavadas e incubadas com os anticorpos anti-superfície CD14, CD11c e CD19 PE durante 30 minutos. As células foram, então, lavadas novamente e fixadas para o preparo das lâminas de microscopia confocal. As três imagens representam, em cada grupo analisado, a marcação apenas com o anticorpo de superfície para identificação da população celular de interesse (primeira coluna - **A**), a marcação com OVA-FITC (segunda coluna - **B**), e a sobreposição das duas imagens (terceira coluna - **C**).

---

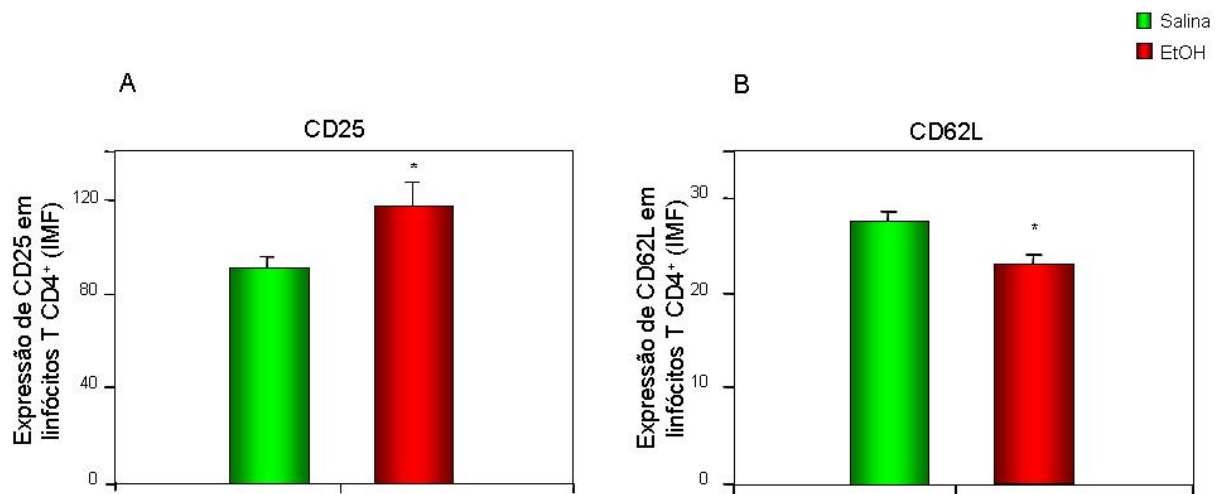
### **5.3 Estudo das alterações fenotípicas em linfócitos T esplênicos após a administração intragástrica aguda de etanol.**

As células apresentadoras de antígenos têm um importante papel no direcionamento da resposta imune de linfócitos T CD4<sup>+</sup> para a tolerância ou para a inflamação. Uma vez demonstradas alterações no perfil e atividade de APCs dos animais tratados com etanol, nosso próximo objetivo foi avaliar o impacto dessas alterações sobre linfócitos T CD4<sup>+</sup>, através da avaliação da expressão de moléculas de superfície celular relacionadas com determinadas atividades em linfócitos T.

É sabido que a molécula CD25 é um importante marcador de linfócitos T ativados, expresso também em células T reguladoras, que apresentam uma atividade relacionada com a supressão de respostas imunes inflamatórias (Yanyan Qu & Yong Zhao, 2007).

A figura 10 A demonstra que há um aumento na intensidade de expressão da molécula CD25 em linfócitos T CD4<sup>+</sup> de animais do grupo tratado com etanol em comparação com animais do grupo tratado com salina.

Após ativação celular, os linfócitos migram do órgão linfóide para a circulação sistêmica, num processo mediado por várias moléculas de adesão vascular (selectinas e integrinas) e quimiocinas. Variações na intensidade de expressão da selectina CD62L constituem uma avaliação importante da ativação precoce de linfócitos. A figura 10 B mostra uma diminuição na intensidade de expressão da selectina CD62L em linfócitos T CD4<sup>+</sup> dos animais do grupo tratado com etanol em comparação ao grupo tratado com salina.

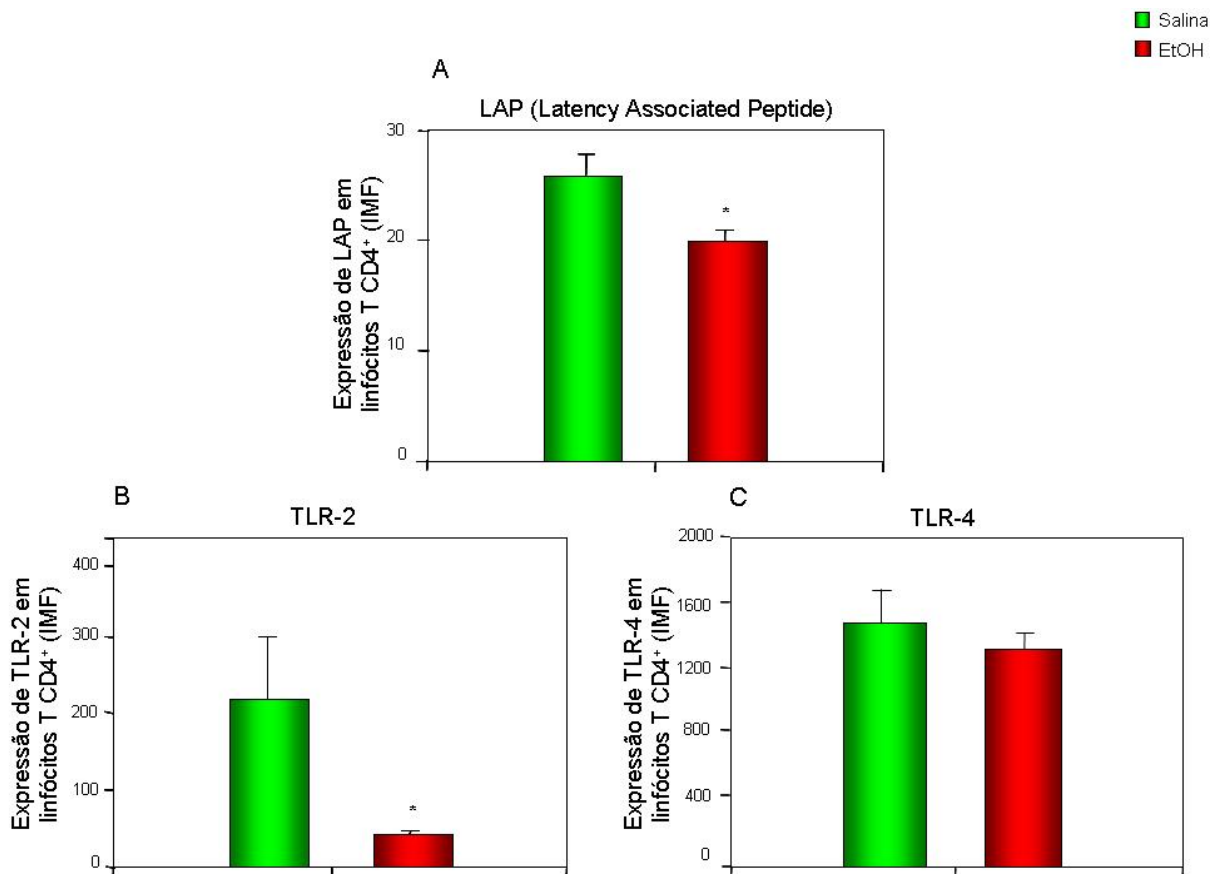


**Figura 10** - Análise da intensidade de expressão das moléculas CD25 (A) e CD62L (B) em linfócitos TCD4<sup>+</sup> do baço. O baço de animais C57BL/6 foi retirado e, 24 horas após a última administração oral de salina ou etanol (EtOH), as células coletadas e incubadas (30 minutos, ao abrigo da luz) com anticorpos monoclonais anti-CD4FITC e anti-CD25PE (CD25); anti-CD3Cy e anti-CD62LFITC (CD62L). Após adição da solução fixadora (MFF), foi realizada a aquisição das amostras em Citômetro de fluxo (FACScalibur), usando ajustes (*settings*) previamente padronizados. Em seguida foi realizada a análise dos dados no programa *CellQuest*. Estes foram tabulados e os resultados expressos graficamente. Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão (EP) da intensidade média de fluorescência (IMF) das moléculas CD25 e CD62L dentro da população de linfócitos TCD4<sup>+</sup> em cada grupo (n=5). Foi realizada a análise estatística através do teste t de *Student* bicaudal. \* representa diferença estatisticamente significativa (p<0.05).

Uma vez observado um aumento na expressão de CD25 em linfócitos T, que é uma molécula primordialmente relacionada com ativação celular, mas também observada em populações de linfócitos com atividades reguladoras, resolvemos esclarecer essa dualidade funcional de linfócitos T CD25, através da avaliação da produção de TGF- $\beta$ . Como a forma ativada do TGF- $\beta$  dura poucos minutos no meio extracelular, resolvemos analisar a sua forma inativa caracterizada por estar ligada a um peptídeo e associada à membrana da célula produtora, denominada de LAP (*Latency Associated Protein*). Interessantemente, observamos uma redução na intensidade de expressão de LAP na membrana de linfócitos T CD4<sup>+</sup> dos animais tratados com etanol em relação aos animais tratados com salina (figura 11 A).

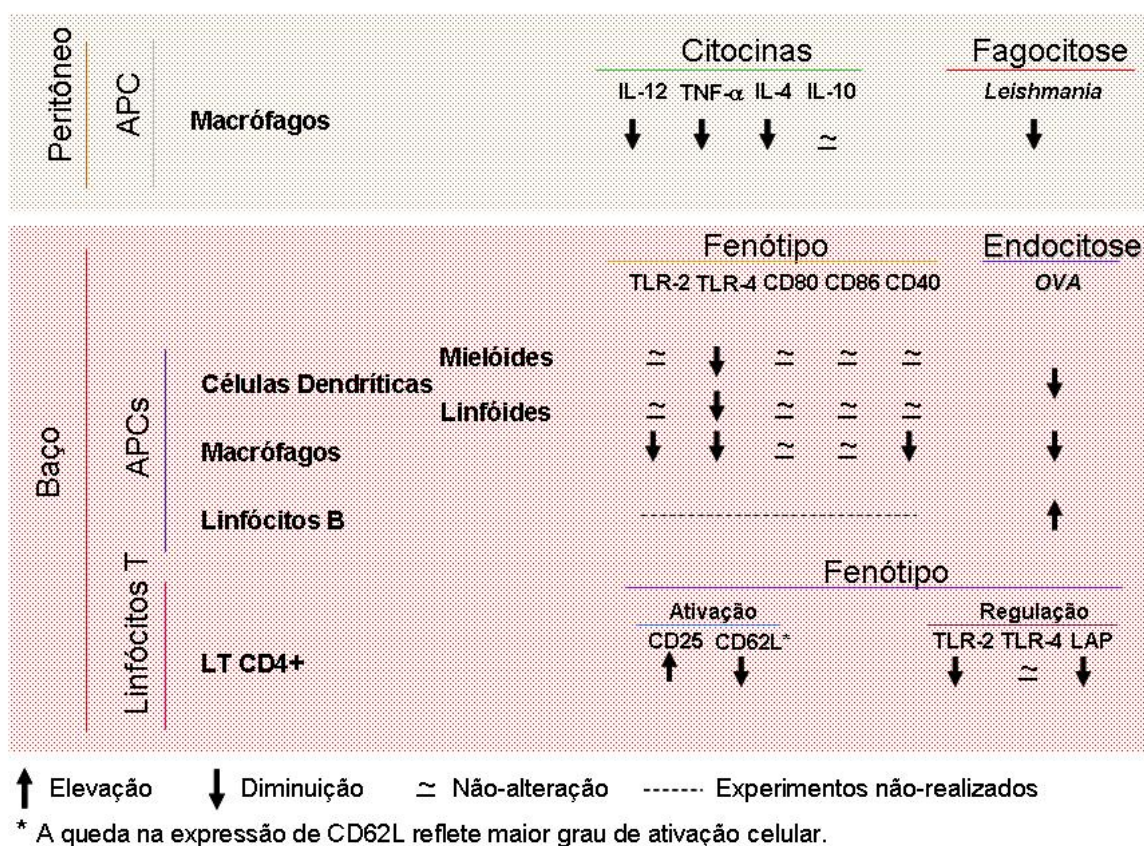
A descoberta relativamente recente da expressão TLRs em linfócitos T tem estimulado investigações para avaliar a função dessas moléculas em diferentes populações de linfócitos, que, de um modo geral, parece estar relacionada com a modulação de atividades efetoras.

A figura 11 B mostra uma diminuição marcante na intensidade de expressão de TLR2 em linfócitos T CD4<sup>+</sup> de animais do grupo tratado com etanol em comparação com o grupo tratado com salina. Entretanto, em relação à intensidade de expressão de TLR-4, não observamos uma diferença significativa entre os grupos (figura 11 C).



## 5.4 Síntese dos resultados

Com o objetivo de facilitar a elaboração das conclusões deste estudo, os resultados encontram-se sumarizados na figura 12.



**Figura 12** – Alterações fenotípicas e funcionais observadas no grupo tratado com etanol em relação ao grupo tratado com salina. A orientação das setas representa a elevação ou diminuição dos parâmetros avaliados no grupo tratado com etanol em relação ao grupo tratado com salina. O símbolo ≈ representa uma não-alteração do parâmetro no grupo tratado com etanol em relação ao grupo tratado com salina. O símbolo ---- representa a não-realização de experimentos.

---

## 6 DISCUSSÃO

Danos à saúde causados pelo consumo abusivo do álcool têm sido amplamente documentados na história do homem. No século passado, o excesso do consumo de álcool estava claramente relacionado à susceptibilidade do hospedeiro a doenças infecciosas, particularmente à pneumonia bacteriana. Recentemente, mostrou-se que ambos os consumos agudo e crônico de álcool causam alterações generalizadas na atividade imunológica com impacto tanto na imunidade inata quanto na adaptativa (Nelson & Kolls, 2002). Podemos citar a diminuição na atividade fagocítica de células pertencentes ao sistema mononuclear fagocitário, como macrófagos e células de Kupffer, a diminuição da capacidade proliferativa de linfócitos T, o aumento da produção de IL-12 e TNF- $\alpha$  por monócitos do sangue periférico, a diminuição na produção de anticorpos, alteração do perfil de citocinas com uma elevação dos níveis de IL-4 e diminuição de IFN- $\gamma$ , mudanças fenotípicas e funcionais em populações celulares de vários órgãos linfóides, dentre outras (Watson *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1993; Lopez *et al.*, 1994; Nelson & Kolls, 2002; Lanzke *et al.*, 2007).

Em nosso estudo, partimos para a investigação de alterações imunológicas que pudessem estar associadas ao consumo agudo de etanol, representado, em nosso modelo experimental, pela administração intragástrica aguda de etanol 50%. A análise das APCs foi de extrema relevância em nosso estudo, uma vez que essas células têm um papel central na determinação da função efetora de linfócitos T após ativação via apresentação de antígenos.

A já citada facilidade de indução da migração de macrófagos para o peritônio e os efeitos sistêmicos da administração intragástrica aguda de etanol, fizeram do peritônio nosso objeto inicial de estudo.

Citocinas e quimiocinas são importantes moléculas mediadoras da resposta inflamatória e da regulação imune (Lundberg & Nyberg, 1998). Sabe-se que, por diferentes vias, o consumo de álcool afeta a síntese e o sítio de citocinas (Daniluk & Kandefér, 1998). Nossos resultados chamam a atenção para a marcante redução na produção de TNF- $\alpha$ , IL-12 e IL-4 por macrófagos peritoneais de animais tratados com etanol após estímulo *in vitro* com PMA. A redução na produção da citocina inflamatória TNF- $\alpha$  observada em nossos resultados está em concordância com o trabalho de Nelson e colaboradores (1989), cujos resultados também demonstraram uma queda na produção de TNF- $\alpha$  por monócitos de camundongos após tratamento agudo (1 dia) com etanol. Uma redução na produção de TNF- $\alpha$  por monócitos de camundongos submetidos a tratamento agudo *in vitro* com etanol também foi observada por Mandrekar e colaboradores (1999). Porém, um estudo de McClain e colaboradores (1999) demonstrou um aumento dos níveis circulantes da citocina inflamatória

---

TNF- $\alpha$  em pacientes com hepatite alcoólica, uma doença induzida pelo consumo prolongado e excessivo de álcool. Uma associação entre o consumo crônico de álcool e o aumento da produção de citocinas foi também observado por Laso e colaboradores (2007), cujo trabalho demonstrou uma elevação da produção de TNF- $\alpha$  e IL-12 por monócitos do sangue periférico de pacientes alcoólatras crônicos. Crews e colaboradores, em seu trabalho, demonstraram que o tratamento crônico (5 a 7 dias) de monócitos com álcool resultou no aumento da produção de TNF- $\alpha$  induzida por LPS. Os mesmos monócitos, porém, quando submetidos a uma exposição aguda (tempo de exposição não definido) ao álcool, tiveram a produção de TNF- $\alpha$  inibida. Dessa maneira, pode-se hipotetizar que as exposições aguda e crônica ao álcool têm efeitos opostos na regulação de citocinas pró-inflamatórias em monócitos.

Células do sistema imune inato iniciam respostas adaptativas através da habilidade de células apresentadoras de antígenos, tais como células dendríticas, macrófagos e linfócitos B, de internalizarem e apresentarem peptídeos antigênicos derivados de proteínas solúveis, patógenos, restos celulares ou outros materiais particulados via complexo de histocompatibilidade principal (MHC) para linfócitos T (Blander, 2007; Watts, 2002). No presente estudo, demonstramos, pela técnica de citometria de fluxo, que a eficiência da fagocitose realizada por macrófagos está diminuída nos animais tratados com etanol. Andrade e colaboradores (*Scandinavian Journal of Immunology*, 2008- artigo submetido) demonstraram que macrófagos peritoneais de animais C57BL/6 tratados com etanol por 4 dias apresentaram, em média, um aumento de 3 a 4 vezes no tempo total de fagocitose de partículas de zimosan não opsonizadas, em comparação a macrófagos de animais tratados com salina. Nossos resultados confirmaram os obtidos pelos autores, uma vez que demonstramos um menor percentual de macrófagos *Leishmania*-FITC no grupo tratado com etanol em comparação com o grupo tratado com salina. Um significado clínico dessas observações poderia estar relacionado a um aumento da incidência de infecções bacterianas em indivíduos consumidores crônicos de álcool (Messingham *et al.*, 2002), devido a problemas na fagocitose de organismos vivos.

Considerando as limitações inerentes ao processo de recrutamento celular para o peritônio, uma vez que os macrófagos foram submetidos a uma pré-ativação pelo uso do tioglicolato, bem como o impacto sistêmico da administração intragástrica aguda de etanol, e visando ampliar a gama de populações celulares analisadas, resolvemos analisar outro compartimento linfóide, o baço.

Já foi demonstrado que o etanol suprime respostas induzidas por TLR4 (Kolls *et al.*, 1995; Yamashina *et al.*, 2000), podendo interferir com vias de sinalização intracelular afetando seletivamente fatores de transcrição nuclear e consequentemente o perfil de citocinas

---

produzidas (Goral *et al.*, 2004; Mandrekar *et al.*, 2002; Yamashina *et al.*, 2000). Nesse sentido, discute-se o papel relevante dos TLRs em determinar o balanço de respostas imunes adaptativas Th1 e Th2. A diminuição na intensidade de expressão de TLR2 em macrófagos e TLR4 em todas as populações de APCs observada nos animais do grupo tratado com etanol quando comparado ao grupo tratado com salina, pode ter um papel importante no desvio da resposta imune para um perfil do tipo 2, com grande produção de IL-4, como demonstrado no trabalho de Andrade e colaboradores (2006). Além disso, TLRs parecem ainda ter um papel importante na regulação da resposta imune através da influência na indução de células T reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Majewska & Szczepanik, 2006), o que corrobora com a possibilidade da prevalência de um perfil imune inflamatório do tipo 2 nos animais tratados com etanol.

O reconhecimento antigênico por linfócitos T específicos e a subsequente ativação celular requerem, além da apresentação do peptídeo pela célula apresentadora de antígeno profissional, um segundo sinal, denominado co-estimulação. A interação entre as moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86, na superfície da célula apresentadora, e a molécula CD28 na superfície da célula T é o principal estímulo para a ativação dos linfócitos T auxiliares. Nossos resultados demonstraram um efeito seletivo da administração de etanol sobre a intensidade de expressão de moléculas co-estimuladoras na superfície de APCs. Apesar de dados na literatura mostrarem um efeito modulador do consumo crônico de etanol sobre a expressão de B7.1 e B7.2 principalmente em células dendríticas (Lau *et al.*, 2006), não observamos alteração na intensidade de expressão de moléculas da família B7 em animais tratados com etanol de maneira aguda. Entretanto, apenas na população de macrófagos observamos uma diminuição na intensidade de expressão da molécula CD40. Benveniste e colaboradores (2004) demonstraram que a interação entre CD40 e seu ligante, CD40L (CD154) promove o aumento da expressão de algumas moléculas co-estimuladoras, tais como B7.1 e B7.2, porém, em nossos resultados, a expressão de moléculas da família B7 na superfície de macrófagos de animais tratados com etanol parece não ter sido afetada pela baixa expressão de CD40.

Além de outros mecanismos, acreditamos que a modulação da expressão de CD40 em macrófagos de animais tratados com etanol possa ser um ponto importante no comprometimento da geração de linfócitos T reguladores nesses animais, visto que, segundo Guiducci e colaboradores (2005), a interação CD40/CD40L regula a homeostase de linfócitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, e que camundongos com o gene de CD40 depletado (CD40<sup>-/-</sup>) apresentam números reduzidos de linfócitos T reguladores no sangue periférico, timo e baço (Mathur *et al.*, 2006). Vale ressaltar que a geração de linfócitos T reguladores é um dos mecanismos



---

fundamentais para o estabelecimento do fenômeno da tolerância oral (Faria & Weiner, 2006), que, por sua vez, está abolida após o consumo agudo do álcool, segundo Andrade e colaboradores (2006).

Em nosso estudo, avaliamos também a habilidade de células apresentadoras de antígenos, sendo, células dendríticas, macrófagos e linfócitos B, de endocitarem a proteína Ovalbumina. Demonstramos, pela técnica de citometria de fluxo, e com confirmação pela microscopia confocal, que macrófagos e células dendríticas de animais tratados com etanol mostraram-se menos eficazes em endocitar OVA-FITC, devido a um menor percentual de células OVA-FITC<sup>+</sup> em relação aos animais tratados com salina. Esse resultado está em concordância com a literatura uma vez que vários estudos têm demonstrado uma correlação entre álcool e redução da capacidade endocítica de APCs (Nelson & Kolls, 2002; Zambell *et al.*, 2004; Heinz & Waltenbaugh, 2007; Du *et al.*, 2007).

Interessantemente, em nosso modelo experimental de estudo, observamos que houve um nítido aumento no percentual de linfócitos B OVA-FITC<sup>+</sup> nos animais tratados com etanol em comparação com as células dos animais tratados com salina. Em adição ao seu papel na imunidade humoral, em diversas circunstâncias, linfócitos B podem contribuir significativamente como APC para a indução da ativação de células T (Rodríguez-Pinto, 2006), devido à sua capacidade de seqüestrar antígenos através do receptor da célula B ou BCR (*B cell receptor*). Apesar dos nossos dados ainda necessitarem de resultados complementares, é possível propor que nos animais tratados com etanol possa estar ocorrendo um provável desvio da hierarquia das APCs, e que a apresentação de antígenos mediada por linfócitos B possa estar proporcionando a geração de linfócitos T com um perfil inflamatório, com grande produção de IL-4. Em um trabalho recente, Noorchashm e colaboradores (2006) demonstraram que a ativação de linfócitos T virgens por linfócitos B, funcionando como APC, tem um papel fundamental na patogênese da rejeição cardíaca aguda contra alo-enxerto.

Em complementação, acreditamos também que o perfil alérgico observado nos animais tratados com etanol (Andrade e colaboradores, 2006), esteja associado a essa captação de antígenos via linfócitos B e seu posterior processamento no interior da célula, proporcionando a geração de epítomos alergênicos com conseqüente ativação de uma resposta Th2, caracterizada por uma grande produção de IL-4 pelos linfócitos T, proporcionando a indução de uma resposta humoral mediada pela produção de IgE.

Diante desses resultados, vale salientar, que os efeitos do etanol sobre APCs são bastante complexos e devem estar relacionados com múltiplas variáveis, tais como, quantidade e extensão da exposição, além da influência de fatores locais e sistêmicos, incluindo citocinas e outras moléculas. Esses efeitos do etanol sobre a expressão de

---

importantes moléculas de superfície celular podem resultar em erros na transdução de sinal mediada por vários receptores.

A forma como o antígeno é apresentado para o linfócito T pela APC poderá ter como consequência a inibição clonal e sua eliminação, caracterizando a tolerância, ou sua ativação e expansão, o que caracteriza um processo inflamatório. Na apresentação de antígenos, alguns fatores como a quantidade do antígeno a ser apresentado para a célula T, a avidéz da apresentação, a participação de moléculas co-estimuladoras e o tempo de interação entre a APC e o linfócito T, são de fundamental importância para o direcionamento de linfócitos T para uma atividade reguladora ou inflamatória (Goodnow, 1996).

Paradoxalmente ao aparente estado de refratariedade funcional apresentado por macrófagos e células dendríticas esplênicas, os linfócitos T do baço mostraram características de células ativadas, ativação esta, provavelmente mediada por linfócitos B, através da expressão de várias moléculas, como descrito abaixo.

A molécula CD25, cadeia  $\alpha$  do receptor da IL-2, representa um importante marcador de células T ativadas, expressa também em células T reguladoras, que funcionam suprimindo respostas imunes a antígenos próprios e/ou não-próprios (Yanyan & Yong, 2007).

A maior expressão de CD25, um importante marcador de ativação celular, em linfócitos T esplênicos de animais tratados com etanol em comparação com animais tratados com salina, *a priori* reflete um maior percentual de linfócitos T ativados em função do processo inflamatório desencadeado pelo etanol, mas cuja atividade efetora, de supressão imune ou inflamação, em nosso trabalho não foi totalmente esclarecida.

Sabe-se que CD62L, uma selectina constitutivamente expressa pelos leucócitos, medeia a adesão e o rolamento leucocitário ao longo do endotélio. Os ligantes da L-selectina são constitutivamente expressos em tecidos linfóides periféricos, sendo também sua expressão induzida por citocinas inflamatórias no endotélio vascular (Kadono *et al.*, 2002). Já se tem demonstrado que uma importante consequência do abuso do álcool é a alteração na distribuição e na migração de células T relacionadas com uma menor expressão de CD62L na superfície celular (Chiappelli, 1995). A diminuição da expressão de CD62L em linfócitos T esplênicos de animais do grupo tratado com etanol em relação aos animais do grupo tratado com salina pode estar refletindo alterações na dinâmica do processo de migração entre compartimentos imunes.

No intuito de direcionar nosso estudo para uma avaliação funcional de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, realizamos análise fenotípica da expressão e moléculas associadas com regulação imune. O mecanismo de supressão ativa da resposta imunológica envolve, além de diversos tipos celulares tais como as células T reguladoras, citocinas como TGF- $\beta$  (transforming growth

---

factor- $\beta$ ). Em nossos resultados, a diminuição da expressão de LAP na membrana de linfócitos T do baço de animais tratados com etanol, pode refletir uma alteração na geração de linfócitos T supressores nesse compartimento imune. Segundo Oida e colaboradores (2006), as células T reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> expressam a forma inativa de TGF- $\beta$  associado à LAP e a função supressora dessas células reguladoras pode ser bloqueada *in vitro* pela adição de um bloqueador para LAP, destacando-se, assim, o papel de LAP na manutenção da função supressora das células T reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. Entretanto, alguns autores têm demonstrado que após a ingestão crônica de etanol há um aumento na expressão da forma ativa de TGF- $\beta$  no pulmão de pacientes com a “síndrome da dificuldade respiratória” (Crews *et al.*, 2006), e no fígado de consumidores crônicos de etanol (Zhuge *et al.*, 2006).

Quando expressos em células apresentadoras de antígenos, os receptores do tipo toll (TLRs) possuem um papel no reconhecimento de antígenos derivados de patógenos e na supressão ativa da resposta imunológica através da indução de células T reguladoras (Kabelitz, 2007; Xu *et al.*, 2004). Porém, se expressos em linfócitos T, TLRs podem modular diretamente as atividades dessas células. Sabe-se que TLR2, TLR3, TLR5 e TLR9 agem como receptores co-estimuladores para aumentar a produção de citocinas em linfócitos T ativados TLR4 parece estar diretamente relacionado à resposta de células T de memória (Cairns, 2006), e ainda TLR2, TLR5 e TLR8 têm um papel fundamental na atividade supressora de células T reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Kabelitz, 2007; Xu *et al.*, 2004). Assim, a considerável redução na expressão de TLR2 em linfócitos T de animais tratados com etanol, quando comparados com animais tratados com salina, pode representar um impacto na atividade de linfócitos T reguladores, estando relacionado ao contexto inflamatório alérgico associado à ingestão de etanol nesses animais. Nossos resultados fornecem subsídios à interpretação do fenômeno refratariedade à indução de tolerância oral observada por Andrade e colaboradores (2006) nos animais tratados com etanol.

---

## **7 CONCLUSÕES**

### **7.1 Análise funcional de células apresentadoras de antígenos peritoneais**

A administração intragástrica aguda de etanol teve um impacto significativo no perfil de citocinas de macrófagos peritoneais, causando uma marcante redução na produção de TNF- $\alpha$ , IL-12 e IL-4. A função de internalização de antígenos por APCs peritoneais também foi afetada pela administração intragástrica aguda de etanol, havendo uma diminuição da capacidade de fagocitose de *Leishmania*-FITC em macrófagos de animais tratados com etanol.

### **7.2 Análise imunofenotípica e funcional de células apresentadoras de antígenos esplênicas**

Em nosso trabalho, em relação à análise imunofenotípica e funcional de APCs esplênicas, observamos que a administração intragástrica aguda de etanol teve um impacto seletivo sobre a população de macrófagos, causando uma diminuição na intensidade de expressão de moléculas de superfície envolvidas com ativação celular, sendo CD40 e TLR-2. Interessantemente, TLR-4 teve a intensidade de expressão diminuída em todas as populações de APCs analisadas, células dendríticas mielóides, linfóides e macrófagos. A função de endocitose de OVA por APCs esplênicas também foi afetada, tendo havido uma diminuição da internalização de OVA por macrófagos e células dendríticas de animais tratados com etanol. A função de captação de antígenos parece ter sido assumida por linfócitos B nos animais tratados com etanol, uma vez que houve um aumento da fagocitose de OVA por essas células em comparação aos linfócitos B de animais tratados com salina.

### **7.3 Análise fenotípica de linfócitos esplênicos**

A administração intragástrica aguda de etanol também repercutiu diretamente sobre a população de linfócitos T esplênicos, que foram ativados em maior percentual do que as células dos animais tratados com salina. Linfócitos T de animais tratados com etanol também

---

apresentaram uma diminuição na expressão de moléculas relacionadas a atividades reguladoras, tais como LAP e TLR2.

Em conjunto, acreditamos que as alterações imunofenotípicas e funcionais nas APCs após o tratamento com etanol, podem comprometer a geração de linfócitos T com atividades reguladoras e induzir o predomínio de um perfil celular inflamatório.

---

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrade MC, Martins-Filho OA, Coelho-Neto J, Mesquita ON, Faria AMC. The long-term impaired macrophages functions are already observed early after high dose ethanol administration. *Scandinavian Journal of Immunology* 2008 – Artigo submetido.
- Andrade MC, Menezes JS, Cassali GD, Martins-Filho OA, Cara DC, Faria AM. Alcohol-induced gastritis prevents oral tolerance induction in mice. *Clin Exp Immunol*. 2006 Nov;146(2):312-22.
- Austin, Gregory A. *Alcohol in Western Society from Antiquity to 1800: A Chronological History*. Santa Barbara, CA: ABC - Clio, 1985.
- Babbitt BP, Allen PM, Matsueda G, Haber E, Unanue E: Binding of immunogenic peptides to Ia histocompatibility molecules. *Nature* 1985, 317:359-361.
- Babor, Thomas. *Alcohol: Customs and Rituals*. New York: Chelsea House, 1986.
- Bacon, M. K., Barry. H., Ill, Child, I. L., and Snyder, C. A cross-cultural study of drinking. 0. *J. Stud. Alcohol*, Suppl. No. 3, April 1965.
- Bagasra O, Howeedy A, Kajdacsy-Balla A. Macrophage function in chronic experimental alcoholism. I. Modulation of surface receptors and phagocytosis. *Immunology*. 1988 Nov;65(3):405-9.
- Banchereau J, Briere F, Caux C *et al*. Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol*. 2000;18:767-811.
- Bautista AP Free radicals, chemokines, and cell injury in HIV-1 and SIV infections and alcoholic hepatitis. *Free Radical Biology Medicine* (2001); 31, 1527–1532.
- Bautista AP. Chronic alcohol intoxication induces hepatic injury through enhanced macrophage inflammatory protein-2 production and intercellular adhesion molecule-1 expression in the liver. *Hepatology*. 1997 Feb;25(2):335-42.
- Braudel, Fernand. *Capitalism and Material Life, 1400-1800*. Translated by Miriam Kochan. New York, NY: Harper and Row, 1974.
- Carreno BM and Collins M. THE B7 FAMILY OF LIGANDS AND ITS RECEPTORS: New Pathways for Costimulation and Inhibition of Immune Responses. *Annual Review of Immunology* 2002; Vol. 20: 29-53.
- Benveniste EN, Nguyen VT, Wesemann DR. Molecular regulation of CD40 gene expression in macrophages and microglia. *Brain Behav Immun*. 2004 Jan;18(1):7-12.
- Billack B. Macrophage activation: role of toll-like receptors, nitric oxide, and nuclear factor kappa B. *Am J Pharm Educ*. 2006 Oct 15;70(5):102.
- Blander, J. M. Signalling and phagocytosis in the orchestration of host defence. *Cellular Microbiology*. 2007; 9(2): 290–299.
- Boydjjeva NI, Dokur M, Advis JP, Meadows GG & Sarkar DK (2002) Beta-endorphin modulation of lymphocyte proliferation: effects of ethanol. *Alcohol Clin Exp* 26, 1719–1727.
- Brandtzaeg, PE. Current understanding of gastrointestinal immunoregulation and its relation to food allergy. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2002; 964:13-45.
- Brunet, J.F., Denizot, F., Luciani, M.F., Roux-Dosseto, M., Suzan, M., Mattei, M.G. and Golstein, P. A new member of the immunoglobulin superfamily—CTLA-4. *Nature* 1987. 328, pp. 267–270.

- 
- Butcher, E.C. Lymphocyte homing and intestinal immunity. *Mucosal Immunology* 1999 2nd edition, Academia Press, London.
- Cairns B, Maile R, Barnes CM, Frelinger JA, Meyer AA. Increased Toll-like receptor 4 expression on T cells may be a mechanism for enhanced T cell response late after burn injury. *J Trauma*. 2006 Aug;61(2):293-8; discussion 298-9.
- Castro A, Lefkowitz DL, Lefkowitz SS. The effects of alcohol on murine macrophage function. *Life Sci*. 1993;52(19):1585-93.
- Chaplin DD. Overview of the human immune response. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117:S430-5
- Chen LH, Huang CY, Osio Y, Fitzpatrick EA, Cohen DA. Effects of chronic alcohol feeding and murine AIDS virus infection on liver antioxidant defense systems in mice. *Alcohol Clin Exp Res*. 1993 Oct;17(5):1022-8.
- Cherrington, Ernest H. (Ed.) *Standard Encyclopedia of the Alcohol Problem*. 6 vols. Westerville, OH: American Issue Publishing Co., 1925-1930.
- Chiappelli F, Kung M, Lee P, Pham L, Manfrini E, Villanueva P. Alcohol modulation of human normal T-cell activation, maturation, and migration. *Alcohol Clin Exp Res*. 1995 Jun;19(3):535-8.
- Chung Y, Lee SH, Kim DH, Kang CY. Complementary role of CD4+CD25+ regulatory T cells and TGF-beta in oral tolerance. *J Leukoc Biol*. 2005 Jun;77(6):906-13.
- CIVIN CI, LOKEN MR. Cell surface antigens on human marrow cells: dissection of hematopoietic development using monoclonal antibodies and multiparameter flow cytometry. *International Journal of Cell Cloning*. vol. 5. p. 267-288. 1987.
- Collins AV, Brodie, D.W., Gilbert, R.J., Iaboni, A., Manso-Sancho, R., Walse, B., Stuart, D.I., van der Merwe, P.A. and Davis, S.J. The interaction properties of costimulatory molecules revisited. *Immunity* 2002.17, pp.
- Cook RT (1998) *Alcohol abuse, alcoholism, and damage to the immune system*. A review. *Alcohol Clin Exp Res* 22.
- Cools N, Ponsaerts P, Tendeloo VFIV, Berneman ZN. Balancing between immunity and tolerance: an interplay between dendritic cells, regulatory T cells, and effector T cells. *Journal of Leukocyte Biology*. 2007 December. Volume 82.
- Coutelle C, Höhn B, Benesova M, Oneta CM, Quattrochi P, Roth A, Schmidt-Gayk H, Schneeweis A, Bastert G, Seitz HK Risk factor in alcohol-associated breast cancer: alcohol dehydrogenase polymorphisms and estrogens. *Int J Oncology* 2004 25:1127–1132.
- Crews FT, Bechara R, Brown LA, Guidot DM, Mandrekar P, Oak S, Qin L, Szabo G, Wheeler M, Zou J. Cytokines and alcohol. *Alcohol Clin Exp Res*. 2006 Apr;30(4):720-30.
- Crivellato E, Vacca A, Ribatti D. Setting the stage: an anatomist's view of the immune system. *Trends Immunol*. 2004. 25 210–217.
- Cyster JG. Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs. *Annu Rev Immunol* 2005;23:127–159.
- Daniluk J, Kandefler-Szerszeń M. The effect of alcohol on the immune system and cytokines. *Postepy Hig Med Dosw*. 1998;52(1):49-65.
- Delvez PJ, Roitt IM. The immune system – First of two parts. *The New England Journal of Medicine* 2000; 343-1.

- 
- Díaz LE, Montero A, González-Gross M, Vallejo AI, Romeo J, Marcos A. Influence of alcohol consumption on immunological status: a review. *Eur J Clin Nutr*. 2002 Aug;56 Suppl 3:S50-3.
- Dominguez-Santalla MJ, Vidal C, Vinuela J, Perez LF & Gonzalez-Quintela A (2001) Increased serum IgE in alcoholics: relationship with Th1/Th2 cytokine production by stimulated blood mononuclear cells. *Alcohol Clin Exp Res* 25, 1198–1205.
- Du SL, Pan H, Lu WY, Wang J, Wu J, Wang JY. Cyclic Arg-Gly-Asp peptide-labeled liposomes for targeting drug therapy of hepatic fibrosis in rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007 Aug;322(2):560-8. Epub 2007 May 17.
- Dubey C, Croft M. Accessory molecule regulation of naive CD4 T cell activation. *Immunol Res*. 1996;15(2):114-25.
- Dustin ML. The immunological synapse. *Arthritis Res*. 2002;4 Suppl 3:S119-25.
- Edwards G, Anderson P, Babor TF, Casswell S, Ferrence R, Giesbrecht N, et al. *Alcohol policy and the public good*. Oxford, Engl: Oxford University Press, 1994.
- Ewald SJ, Shao H. Ethanol increases apoptotic cell death of thymocytes in vitro. *Alcohol Clin Exp Res*. 1993 Apr;17(2):359-65.
- Faria AM, Weiner HL. Oral tolerance. *Clin Dev Immunol*. 2006 Jun-Dec;13(2-4):147-57.
- French SW. Ethanol and hepatocellular injury. *Clin Lab Med*. 1996 Jun;16(2):289-306.
- Friedl P, den Boer AT, Gunzer M. Tuning immune responses: diversity and adaptation of the immunological synapse. *Nat Rev Immunol*. 2005 Jul;5(7):532-45.
- Goodnow, C. C. Balancing immunity and tolerance: deleting and tuning lymphocyte repertoires. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Mar 19;93(6):2264-71.
- Goral, J., Choudhry, M. A., & Kovacs, E. J. Acute ethanol exposure inhibits macrophage IL-6 production: role of p38 and ERK1/2 MAPK. *J Leukoc Biol* 2004; 75, 553–559.
- Grewal, I. S., and R. A. Flavell. CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annu. Rev. Immunol*. 1998.16:111–135.
- Guiducci C, Valzasina B, Dislich H, Colombo MP. CD40/CD40L interaction regulates CD4+CD25+ T reg homeostasis through dendritic cell-produced IL-2. *Eur J Immunol*. 2005 Feb;35(2):557-67.
- Hedrick SM, Nielsen EA, Kavaler J, Cohen DI, Davis MM: Sequence relationships between putative T-cell receptor polypeptides and immunoglobulins. *Nature* 1984, 308:153-158.
- Heinz R, Waltenbaugh C. Ethanol Consumption Modifies Dendritic Cell Antigen Presentation in Mice. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* October 2007; Vol. 31, No. 10.
- Huang, C. T., Workman, C. J., Flies, D., Pan, X., Marson, A. L., Zhou, G., Hipkiss, E. L., Ravi, S., Kowalski, J., Levitsky, H. I., Powell, J. D., Pardoll, D. M., Drake, C. G., Vignali, D. A. Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity* 2004 21, 503–513.
- Inoue H, Seitz HK. Viruses and alcohol in the pathogenesis of primary hepatic cancer. *Eur J Cancer Prev* 200110:1– 4.
- Jackson R. Cardiovascular disease and alcohol consumption:evidence of benefit from epidemiologic studies. *ContempDrug Prob* 1994;21:5-24.
- Jerrells TR, Smith W, Eckardt MJ. Murine model of ethanol-induced immunosuppression. *Alcohol Clin Exp Res*. 1990 Aug;14(4):546-50.



- 
- Jerrels, T. R. and Sibley, D. Effects of ethanol on T-cell-mediated immunity to infectious agents. In *Drugs of Abuse, Immunity and Infections* (1996), Friedman, H., Klein, T. W. and Specter, S. eds, pp. 129–141.
- Kabelitz D. Expression and function of Toll-like receptors in T lymphocytes. *Curr Opin Immunol*. 2007 Feb;19(1):39-45.
- Kadono T, Venturi GM, Steeber DA, Tedder TF. Leukocyte Rolling Velocities and Migration Are Optimized by Cooperative L-Selectin and Intercellular Adhesion Molecule-1 Functions. *The Journal of Immunology*, 2002, 169: 4542-4550.
- Kaiserlian, D., Etchart, N.. Entry sites for oral vaccines and drugs: A role for M cells, enterocytes and dendritic cells? *Seminars in Immunology*, 1999 - vol 11, pp:217-224.
- Khalil N. Post translational activation of latent transforming growth factor beta (L-TGF-beta): clinical implications. *Histol Histopathol*. 2001 Apr;16(2):541-51.
- Kolls, J. K., Xie, J., Lei, D., Greenberg, S., Summer, W. R., & Nelson, S. Differential effects of in vivo ethanol on LPS-induced TNF and nitric oxide production in the lung. *Am J Physiol* 1995; 268(6 Pt 1), L991–L998.
- Kopp, E., and R. Medzhitov. 2003. Recognition of microbial infection by Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol*. 2003 Aug;15(4):396-401.
- Lai L, Alaverdi N, Maltais L, Morse HC 3rd. Mouse cell surface antigens: nomenclature and immunophenotyping. *J Immunol*. 1998 Apr 15;160(8):3861-8.
- Lanzke N, Kleinwächter R, Kerschischnik S, Sargsyan L, Groneberg DA, Kamradt T, Liesenfeld O, Krenn V, Sander M, Spies C. Differential effects of ethanol on IFN-gamma- and TNF-alpha-producing splenic T lymphocytes in a murine model of gram-negative pneumonia. *Addict Biol*. 2007 Mar;12(1):59-68.
- Laso FJ, Vaquero JM, Almeida J, Marcos M, Orfao A. Chronic alcohol consumption is associated with changes in the distribution, immunophenotype, and the inflammatory cytokine secretion profile of circulating dendritic cells. *Alcohol Clin Exp Res*. 2007 May;31(5):846-54. Epub 2007 Mar 26.
- Lau AH, Abe M, Thomson AW. Ethanol affects the generation, cosignaling molecule expression, and function of plasmacytoid and myeloid dendritic cell subsets in vitro and in vivo. *J Leukoc Biol*. 2006 May;79(5):941-53. Epub 2006 Feb 14.
- Leenen P.J., K. Radosevic, J.S. Voerman, B. Salomon, N. van Rooijen, D. Klatzmann, W. van Ewijk. Heterogeneity of mouse spleen dendritic cells: in vivo phagocytic activity, expression of macrophage markers, and subpopulation turnover. *J. Immunol* 1998. 160:2166–73
- Liang B, Mamula MJ. Molecular mimicry and the role of B lymphocytes in the processing of autoantigens. *Cell. Mol. Life Sci*. 2000. 57 561–568.
- Linsley, P.S., Greene, J.L., Brady, W., Bajorath, J., Ledbetter, J.A. and Peach, R. Human B7–1 (CD80) and B7–2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors. *Immunity* 1994. 1, pp. 793–801.
- Liu YJ. Dendritic Cell Subsets and Lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. *Cell* 2001;106: 259-262.
- Liu Z, Geboes K, Hellings P, Maerten P, Heremans H, Vandenberghe P, Boon L, van Kooten P, Rutgeerts P, Ceuppens JL. B7 interactions with CD28 and CTLA-4 control tolerance or induction of mucosal inflammation in chronic experimental colitis. *J Immunol*. 2001 Aug 1;167(3):1830-8.

- 
- Lopez MC, Huang DS, Borgs P, Wang Y, Watson RR. Modification of lymphocyte subsets in the intestinal-associated immune system and thymus by chronic ethanol consumption. *Alcohol Clin Exp Res*. 1994 Feb;18(1):8-11.
- Lundberg IE, Nyberg P. New developments in the role of cytokines and chemokines in inflammatory myopathies. *Curr Opin Rheumatol*. 1998 Nov;10(6):521-9.
- Maher JJ. Rat hepatocytes and Kupffer cells interact to produce interleukin-8 (CINC) in the setting of ethanol. *Am J Physiol*. 1995 Oct;269(4 Pt 1):G518-23.
- Majewska M, Szczepanik, M. The role of Toll-like receptors (TLR) in innate and adaptive immune responses and their function in immune response regulation. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2006;60:52-63.
- Mandrekar P, Bellerose G, & Szabo G. Inhibition of NF- $\kappa$ B binding correlates with increased nuclear glucocorticoid receptor levels in acute alcohol-treated human monocytes. *Alcohol Clin Exp Res* 2002; 26, 1872–1879.
- Mandrekar P, Dolganiuc A, Bellerose G, Kodys K, Romics R, Nizamani R, Szabo G. Acute alcohol inhibits the induction of regulatory factor  $\kappa$ B activation through CD14/toll-like receptor 4, interleukin-1 and tumor necrosis factor receptors: a common mechanism independent of inhibitory  $\kappa$ B alpha degradation? *Alcoholism: Clin Exp Res* 2002 26:1609–1614.
- Marek A, Brodzicki J, Liberek A, Korzon M. TGF-beta (transforming growth factor-beta) in chronic inflammatory conditions - a new diagnostic and prognostic marker? *Med Sci Monit*. 2002 Jul;8(7):RA145-51.
- Mayer L. Mucosal immunity and gastrointestinal antigen processing. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*., 2000; 30 Suppl:S4-12.
- Mathur RK, Awasthi A, Saha B. The conundrum of CD40 function: host protection or disease promotion? *Trends Parasitol*. 2006 Mar;22(3):117-22.
- McClain C, Barve S, Deaciue L, Kugelmas M, Hill D. Cytokines in alcoholic liver disease. *Semin Liver Dis* 1999 19:205–219.
- McCoy CE, O'Neill LA. The role of toll-like receptors in macrophages. *Front Biosci*. 2008 Jan 1;13:62-70.
- McCullough KC, Summerfield A. Basic concepts of immune response and defense development. *ILAR J*. 2005;46(3):230-40.
- McElduff P, Dobson AJ. How much alcohol and how often? Population based case-control study of alcohol consumption and risk of a major coronary event. *BMJ* 1997; 314: 1159.
- McHugh, R. S., Whitters, M. J., Piccirillo, C. A., Young, D. A., Shevach, E. M., Collins, M., Byrne, M. C. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* 2002 16, 311–323.
- Mellman I. Antigen processing and presentation by dendritic cells: cell biological mechanisms. *Adv Exp Med Biol*. 2005;560:63-7.
- Messingham KA, Faunce DE, Kovacs EJ. Alcohol, injury, and cellular immunity. *Alcohol*. 2002 Nov;28(3):137-49.
- Mestecky J, McGhee JR, Michalek SM, Arnold RR, Crago SS, Babb JL. Concept of the local and common mucosal immune response. *Adv Exp Med Biol*., 1978; 107:185-192.
- Millikan LE. History and Epidemiology of alcohol use and abuse. *Clin Dermatol*. 1999 Jul-Aug;17(4):353-6.

- 
- Morio LA, Chiu H, Sprowles KA, Laskin DL. Functional heterogeneity of rat hepatic and alveolar macrophages: effects of chronic ethanol administration. *J Leukoc Biol.* 2000;68:614–20.
- Munger JS, Harpel JG, Gleizes PE, Mazzieri R, Nunes I, Rifkin DB. Latent transforming growth factor-beta: structural features and mechanisms of activation. *Kidney Int.* 1997 May;51(5):1376-82.
- Murray RP, Connett JE, Tyas SL, et al. Alcohol volume, drinking pattern, and cardiovascular disease morbidity and mortality: is there a U-shaped function? *Am J Epidemiol* 2002; 155: 242–48.
- Nelson S, Bagby GJ, Bainton BG, Summer WR. The effects of acute and chronic alcoholism on tumor necrosis factor and inflammatory response. *J Infect Dis* 1989 160: 422–429.
- Nelson S, Kolls JK. 2002. Alcohol, host defence and society. *Nat Rev Immunol* Mar;2(3):205-9.
- Noorchashm H, Reed AJ, Rostami SY, Mozaffari R, Zekavat G, Koeberlein B, Caton AJ, Naji A. B cell-mediated antigen presentation is required for the pathogenesis of acute cardiac allograft rejection. *J Immunol.* 2006 Dec 1;177(11):7715-22.
- Oida T, Xu L, Weiner HL, Kitani A, Strober W. TGF-beta-mediated suppression by CD4+CD25+ T cells is facilitated by CTLA-4 signaling. *J Immunol.* 2006 Aug 15;177(4):2331-9.
- Patrick, Charles H. Alcohol, Culture, and Society. Durham, NC: Duke University Press, 1952. Reprint edition by AMS Press, New York, 1970.
- Porter, Roy. Introduction. In: Sournia, Jean-Charles. *A History of Alcoholism*. Trans. by Nick Hindley and Gareth Stanton. Oxford: Basil Blackwell, 1990. Pp. ix-xvi.
- Pruett SB, Han YC, Wu WJ. A brief review of immunomodulation caused by acute administration of ethanol: involvement of neuroendocrine pathways. *Alcohol Alcohol Suppl.* 1994;2:431-7.
- Pulendran B., J. Lingappa, M.K. Kennedy, J. Smith, M. Teepe, A. Rudensky, C.R. Maliszewski, E. Maraskovsky. Developmental pathways of dendritic cells in vivo: distinct function, phenotype, and localization of dendritic cell subsets in FLT3 ligand-treated mice. *J.Immunol.* 1997 159:2222–31
- Rehm J, Sempos CT. Alcohol consumption and mortality -questions about causality, confounding and methodology. *Addiction* 1995; 90:493-8.
- Rimm EB, Klatsky A, Grobbee D, Stampfer MJ. Review of moderate alcohol consumption and reduced risk of coronary heart disease: is the effect due to beer, wine, or spirits. *BMJ.* 1996 Mar 23;312(7033):731-6.
- Rodríguez-Pinto D. B cells as antigen presenting cells. *Cell Immunol.* 2006 Dec;238(2):67-75.
- Romeo J, Warnberg J, Di'az LE, Gonza'lez-Gross M & Marcos A Effects of moderate beer consumption on first-line immunity of healthy adults. *J Physiol Biochem* 2007 63, 153–160.
- Romeo J, Warnberg J, Nova E, Di'az LE, Gonza'lez-Gross M & Marcos A Changes in the Immune System after Moderate Beer Consumption. *Ann Nutr Metab* 2007 51, 359–366.
- Room R, Babor T, Rehm J. Alcohol and public health. *Lancet* 2005; 365: 519-30.
- Roselle, G. A. Alcohol and the immune system. *Alcohol Health and Research World* (1992); 16, 16–22.

- 
- Rossi M, Young JW. Human dendritic cells: potent antigen-presenting cells at the crossroads of innate and adaptive immunity. *J Immunol*. 2005 Aug 1;175(3):1373-81.
- Rumfelt LL, Zhou Y, Rowley BM, Shinton SA, Hardy RR. Lineage specification and plasticity in CD19- early B cell precursors. *J Exp Med*. 2006 Mar 20;203(3):675-87.
- Rutherford MS, Witsell A, Schook LB. Mechanisms generating functionally heterogeneous macrophages: chaos revisited. *J Leukoc Biol*. 1993;53:602-18.
- Sakaguchi, S. Naturally arising CD4<sub>+</sub> regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu. Rev. Immunol* 2004. 22, 531-562.
- Saalmüller A. New understanding of immunological mechanisms. *Veterinary Microbiology* 2006; 117: 32-38.
- Sato K, Fujita S. Dendritic cells: nature and classification. *Allergol Int*. 2007 Sep;56(3):183-91. Epub 2007 Aug 1.
- Shortman K, Liu YJ. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat. Rev. Immunol*. 2002; 2:151-161.
- Silvain C, Patry C, Launay P, Lehuen A, Monteiro RC. Altered expression of monocyte IgA Fc receptors is associated with defective endocytosis in patients with alcoholic cirrhosis. Potential role for IFN- $\gamma$ . *J Immunol*. 1995 Aug 1;155(3):1606-18.
- Springer TA. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu Rev Physiol*. 1995;57:827-72.
- Standridge JB, Zylstra RG, Adams SM. Alcohol Consumption: An Overview of Benefits and Risks. *Southern Medical Journal*. 2004. July. 97(7):664-672.
- Steinman RM, Turley S, Mellman I, Inaba K. The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J Exp Med*. 2000 Feb 7;191(3):411-6.
- Stephen TL, Niemeyer M, Tzianabos AO, Kroenke M, Kasper DL, Kalka-Moll WM. Effect of B7-2 and CD40 signals from activated antigen-presenting cells on the ability of zwitterionic polysaccharides to induce T-Cell stimulation. *Infect Immun*. 2005 Apr;73(4):2184-9.
- Szabo G. Consequences of alcohol consumption on host defence. *Alcohol Alcohol* 1999 34, 830-841.17.
- Szabo G, Catalano D, White B, Mandrekar P. Acute alcohol consumption inhibits accessory cell function of monocytes and dendritic cells. *Alcohol Clin Exp Res* 2004 28:824-828.
- Szabo, G., Mandrekar, P., Verma, B. and Catalano, D. Acute ethanol uptake prior to injury modulates monocyte TNF $\alpha$  production and mononuclear cell apoptosis. *Immune Consequences of Trauma and Sepsis* 1995, Faist, E. ed., pp. 252-260. Springer, Berlin.
- Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol*. 2005 Jan;17(1):1-14.17: 1-14.
- Thakker KD. An overview of health risks and benefits of alcohol consumption. *Alcohol Clin Exp Res*. 1998 Oct;22(7 Suppl):285S-298S.
- Taskalova-Hogenova H, Tuckova L, Mestecky J, Kolinska J, Rossmann P, Stepankova R, Kozakova H, Hudcovic T, Hrnecir T, Frolova L, Kverka M. Interaction of mucosal microbiota with the innate immune system. *Scand J Immunol*. 2005. 62 Suppl 1:106-113.
- Toda A, Piccirillo CA. Development and function of naturally occurring CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Journal of Leukocyte Biology*. 2006;80:458-470.

- 
- Tseng SY, Otsuji M, Gorski K, Huang X, Slansky JE, Pai SI, Shalabi A, Shin T, Pardoll DM, Tsuchiya H: B7-DC a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells. *J Exp Med* 2001, 193:839-846.
- Vaz NM. Immunological tolerance and dogma. *Med Hypotheses*. 1979 Sep;5(9):1037-43.
- Viala-Artigues J, & Mechetti C. *Histoire de l'alcool archéologie partie 1*. 2003. Disponible em: <http://www.alcoologie.org/Histoire-de-l-alcool-archeologie,118.html>
- Viala-Artigues J, & Mechetti C. *Histoire de l'alcool archéologie partie 2*. 2003. Disponible em: <http://www.alcoologie.org/Histoire-de-l-alcool-archeologie.html>
- Vitale, M. Time for integration: communication in the immune system. *Acta Biomed* 2007; 78; Suppl 1: 227-230
- von Andrian UH, Mempel TR. Homing and cellular traffic in lymph nodes. *Nat Rev Immunol* 2003;3:867-878.
- Waldmann TA. The interleukin-2 receptor. *J Biol Chem*. 1991 Feb 15;266(5):2681-4.
- Watson RR, Borgs P, Witte M, McCuskey RS, Lantz C, Johnson MI, Mufti SI, Earnest DL. Alcohol, immunomodulation, and disease. *Alcohol Alcohol*. 1994 ar;29(2):131-9.
- Watts, C. Phagocytosis: how the phagosome became the phag-ER-some. *Curr Biol*. 2002 Oct 1;12(19):R666-8.
- Weiner HL. Current issues in the treatment of human diseases by mucosal tolerance. *Ann N Y Acad Sci*. 2004 Dec;1029:211-24.
- Whitmire, J. K., R. A. Flavell, I. S. Grewal, C. P. Larsen, T. C. Pearson, and R. Ahmed. 1999. CD40-CD40 ligand costimulation is required for generating antiviral CD4 T cell responses but is dispensable for CD8 T cell responses. *J. Immunol*. 163:3194-3201.
- Wittig BM, Zeitz M. The gut as an organ of immunology. *Int J Colorectal Dis*. 2003 May;18(3):181-7.
- Wu, L., C.L. Li, K. Shortman. Thymic dendritic cell precursors: relationship to the T lymphocyte lineage and phenotype of the dendritic cell progeny. *J. Exp. Med*. 1996 184:903-11
- Xu D, Liu H, Komai-Koma M. Direct and indirect role of Toll-like receptors in T cell mediated immunity. *Cell Mol Immunol*. 2004 Aug;1(4):239-46.
- Yamashina, S., Wheeler, M.D., Rusyn, I., Ikejima, K., Sato, N., & Thurman, R. G. Tolerance and sensitization to endotoxin in Kupffer cells caused by acute ethanol involve interleukin-1 receptor-associated kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 277, 686-690.
- Yanyan Qu, Yong Zhao. Regulatory CD4CD25 T-cells are Controlled by Multiple Pathways at Multiple Levels. *International Reviews of Immunology*, Volume 26, Issue 3 & 4 May 2007 , pages 145 – 160
- Zambell KL, Phelan H, Vande Stouwe C, Zhang P, Shellito JE, Molina PE. Acute alcohol intoxication during hemorrhagic shock: impact on host defense from infection. *Alcohol Clin Exp Res*. 2004 Apr;28(4):635-42.
- Zhuge J, Cederbaum AI. Increased toxicity by transforming growth factor-beta 1 in liver cells overexpressing CYP2E1. *Free Radic Biol Med*. 2006 Oct 1;41(7):1100-12. Epub 2006 Jul 4.
- Zuible A, Wiener E, Wickramasinghe SN. In vitro effects of ethanol on the phagocytic and microbial killing activities of normal human monocytes and monocyte-derived macrophages. *Clin Lab Haematol*. 1992;14(2):137-47.