



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS**

JOÃO CARLOS SANTOS HOCAYEN

**EFEITOS DA INTOXICAÇÃO AGUDA COM ETANOL SOBRE
A EXSUDAÇÃO DE NEUTRÓFILOS PARA A CAVIDADE
PERITONEAL DE CAMUNDONGOS INOCULADOS COM
*Staphylococcus aureus***

VITÓRIA
2013

JOÃO CARLOS SANTOS HOCAYEN

**EFEITOS DA INTOXICAÇÃO AGUDA COM ETANOL SOBRE
A EXSUDAÇÃO DE NEUTRÓFILOS PARA A CAVIDADE
PERITONEAL DE CAMUNDONGOS INOCULADOS COM
*Staphylococcus aureus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Doenças Infecciosas, área de concentração em Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientador: Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira

VITÓRIA
2013

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

H685e Hocayen, João Carlos Santos, 1971-
Efeitos da intoxicação aguda com etanol sobre a exsudação
de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos
inoculados com *Staphylococcus aureus* / João Carlos Santos
Hocayen. – 2013.
66 f. : il.

Orientador: Fausto Edmundo Lima Pereira.
Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas) –
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da
Saúde.

1. Alcoolismo. 2. Neutrófilos. 3. Inflamação. I. Pereira, Fausto
Edmundo Lima. II. Universidade Federal do Espírito Santo.
Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

PARECER ÚNICO DA COMISSÃO JULGADORA DE
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

O mestrando JOÃO CARLOS SANTOS HOCAYEN apresentou a dissertação intitulada “EFEITOS DA INTOXICAÇÃO AGUDA COM ETANOL SOBRE A EXSUDAÇÃO DE NEUTRÓFILOS PARA A CAVIDADE PERITONEAL DE CAMUNDONGOS INOCULADOS COM *Staphylococcus aureus*” em sessão pública, no dia 30 de agosto de 2013, como requisito final para obtenção do título de **Mestre em Doenças Infecciosas**, do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo.

Considerando a apresentação oral dos resultados, a qualidade e relevância dos mesmos, a Comissão Examinadora decidiu () **aprovar** () **reprovar** a dissertação para habilitar o farmacêutico JOÃO CARLOS SANTOS HOCAYEN a obter o Grau de MESTRE EM DOENÇAS INFECCIOSAS.

Vitória, ES, 30 de agosto de 2013

Prof. Dra. Maria da Penha Zago Gomes
(Membro Externo)

Prof. Dra. Ana Paula Ferreira Nunes
(Membro Interno)

Prof. Dr. Daniel Cláudio de Oliveira Gomes
(Membro Interno)

Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me mostrar a cada dia, que o caminho da bondade e da fé valem muito a pena.

À minha família pelo incentivo, especialmente a meus pais por me ensinarem, que o estudo e o conhecimento são fundamentais para o desenvolvimento humano.

À minha filha pelo amor incondicional.

À minha mulher Débora, por entender a minha ausência, pela participação e apoio.

Ao Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira, cientista por vocação e pessoa admirável, que me aceitou como aluno, me orientou com muita competência, me ensinando a verdadeira importância de estudar.

À Prof.^a Ana Paula, do Laboratório de Resistência Bacteriana - UFES, pela disponibilização da cepa de *Staphylococcus aureus*;

Ao Prof. Daniel Gomes e à Prof.^a Sandra L. V. Von Zeidler por terem me recebido e permitido utilizar os laboratórios de Imunologia e Patologia Molecular para execução de parte dos experimentos.

Aos meus colegas do mestrado pela convivência e simpatia.

Aos professores e funcionários do NDI pela ajuda constante.

À Débora Corona por me ajudar na execução dos experimentos.

À amiga Luciana Gomes por sempre me receber muito bem e pelos bons momentos de convivência.

À Débora Melo pela ajuda no projeto.

Ao Prof. João Paulo Bestete de Oliveira pela valorosa contribuição na compilação dos resultados e orientação nos cálculos estatísticos.

À Prof.^a Lenir Cardoso Porfírio pela valiosa ajuda em discussões pertinentes ao projeto.

A meu filho que chega, trazendo muito amor e luz no meu caminho.

RESUMO

Introdução. Há demonstrações que uma intoxicação aguda pelo etanol tem efeitos antiinflamatórios, com redução da exsudação de neutrófilos e com aumento da susceptibilidade a bactérias, especialmente *Streptococcus pneumoniae*. No entanto não se conhece o tempo durante o qual persistem os efeitos inibidores da exsudação celular e da redução da atividade microbida de leucócitos, após a intoxicação etílica aguda. **Objetivos.** Avaliar o tempo após uma intoxicação etílica aguda no qual persistem os efeitos inibidores da exsudação de neutrófilos e a redução da capacidade microbida do exsudato inflamatório em um modelo de peritonite induzida por *Staphylococcus aureus*. **Métodos.** Camundongos C57BL/6 receberam, por gavagem, uma dose de 7mg de etanol/g peso corporal em solução a 40%. Uma, 12,24, 48 e 72 horas após, receberam uma inoculação intraperitoneal de *Staphylococcus aureus* (0,5 ml contendo $6 \text{ a } 9 \times 10^8$ UFC/mL; cepa ATCC 25923). Seis horas depois, os animais eram eutanasiados e a cavidade peritoneal lavada com PBS/EDTA 0,01M; uma alíquota era utilizada para contagem do número de UFC e a outra para contagem global e específica das células do exsudato utilizando câmara de Neubauer e citocentrífuga para confecção de esfregaços, corados por corante hematológico rápido (Dipquick). A contagem de UFC foi feita pelo método de diluição seriada com semeadura em placas de ágar Müller-Hinton. **Resultados.** Todos os animais que receberam etanol apresentaram sinais de embriaguês, que chegou a um estado de letargia profunda do qual todos os animais se recuperavam em, no máximo, 45 minutos. A dose de etanol utilizada induziu involução do timo, evidente 24 horas após a alcoolização, mas com recuperação após 120 horas. Nos animais alcoolizados que receberam o inóculo do estafilococo houve redução significativa da exsudação celular, devido a redução da exsudação de neutrófilos, até 24 horas após a ingestão do etanol. A análise dos esfregaços mostrava maior quantidade de bactérias fora das células no grupo etanol e o número de UFC foi maior no período avaliado, mas a diferença não foi estatisticamente significativa. **Conclusão.** Confirma-se os efeitos antiinflamatórios da intoxicação etílica aguda, com redução significativa no exsudato de leucócitos, até 24 horas após a exposição ao etanol; essa redução decorre especialmente da redução da exsudação de neutrófilos, já que o número de mononucleares exsudados no período avaliado foi semelhante nos dois grupos experimentais. O poder microbida da cavidade peritoneal frente aos estafilococos foi menor no grupo etanol embora sem significância estatística, possivelmente porque os macrófagos residentes foram menos afetados pelos efeitos do etanol.

Palavras-chaves: Alcoolismo agudo, neutrófilos, inflamação.

ABSTRACT

Introduction. There are indications that an acute intoxication with ethanol has anti-inflammatory effects, reducing the exudation of neutrophils and increasing susceptibility to infections, especially with *Streptococcus pneumoniae*. However we do not know the time these inhibitory effects of cellular exudation and reduced microbicidal activity of leukocytes persist after one acute intoxication with ethanol. Objective. To evaluate the time of duration of the inhibitory effects of exudation of neutrophils and reduction of microbicidal activity in a model of peritonitis induced by *Staphylococcus aureus* after an acute ethanol intoxication in mice. Methods. C57BL/6 mice received by gavage one dose of 7mg of ethane/g body weight. Control animals received the same volume of distilled water. One, 12, 24, 48 and 72 hours after ethanol intoxication all mice received intra-peritoneal injection of *Staphylococcus aureus* (0.5 ml containing 6 to 9×10^8 CFU/mL of ATCC 25923 strain). Six hours later the animals were euthanized, and the peritoneal cavity rinsed with PBS / EDTA 0.01 M; one aliquot was used CFU counts and the other for global and specific count of cells in the exudates, using a Neubauer chamber and a cytopspin to obtain smears that were stained by fast staining method with Dipquick. CFU counts were made by the method of serial dilution. Results. All animals receiving ethanol showed signs of intoxication, which reached a state of profound lethargy and all animals were recovering 45 minutes later. The ethanol dose used induced thymic involution, evident 24 hours after alcohol ingestion, with recovery being evident after 120 hours. In animals that received ethanol a significant reduction in the number of cells in exudates was observed; this reduction was due to reduction of exudation of neutrophils up to 24 hours after ethanol intoxication. The number of mononuclear cells were similar in both groups. Microscopic analysis of the smears showed bacteria out of the cells, more frequently in the ethanol group and the number of CFU was lower in this group but the observed difference was not statistically significant. Conclusion. Results confirm the anti-inflammatory effects of an acute ethanol intoxication, with a significant reduction in exudates of neutrophils, but with no significant changes in exudates of mononuclear leukocytes. The microbicidal activity of peritoneal cavity against staphylococci was lower in the ethanol group although without statistical significance, possibly because the resident macrophages were less affected by the effects of ethanol.

Key words: Acute alcoholism, neutrophils, inflammation

SIGLAS E ABREVIATURAS

%	por cento
°C	grau Celsius
AIDS	do inglês " <i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i> "
ATCC	do inglês " <i>American Type Culture Collection</i> "
CCl4	Tetracloroeto de carbono
CINC	Fator neutrofílico quimioatraente induzido por citocinas
CO2	Dióxido de carbono
DO	Densidade Óptica
EDTA	do inglês " <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> "
et al.	e colaboradores
g	grama
G-CSF	do inglês " <i>Granulocyte colony-stimulating factor</i> "
GM-CSF	do inglês " <i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i> "
h	hora
HUVECs	do inglês " <i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i> "
ICAM-1	do inglês " <i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i> "
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL-1	Interleucina 1
IL-1α	Interleucina 1 fração Alfa
IL-1 β	Interleucina 1 fração Beta
IL-10	Interleucina 10
IL-17	Interleucina 17
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
INFγ	Interferon gama
IRAK-M	do inglês " <i>IL1 receptor-associated kinase M</i> "
IκBα	do inglês " <i>Inhibitor Protein of NF-κB</i> "
LPS	Lipopolissacarídeo

LTB4	Leucotrieno B4
M	Molaridade
MCP-1	do inglês " <i>Monocyte Chemotatic Protein-1</i> "
M-CSF	do ingles " <i>Macrophage Colony-Stimulating Factor</i> "
mg	Miligrama
MIP-2	do inglês " <i>Macrophage Inflammatory Protein 2</i> "
mL	Mililitros
NF-κB	Fator Nuclear kappa B (do inglês: <i>Nuclear Factor kappa B</i>)
NK	do inglês " <i>Natural killer</i> "
NKG2D	do ingles " <i>Natural killer group 2, member D</i> "
nm	nanômetro
PBS	do inglês " <i>Phosphate Buffered saline</i> "
PECAM-1	do ingles " <i>Platelled Endothelial Cell Adhesion Mollecule</i> "
PMNs	Polimorfonucleares
pH	Potencial hidrogeniônico
PKC	do inglês " <i>Protein Kinase C</i> "
PMN	Polimorfonucleares
RNAm	do inglês " <i>Messenger Ribonucleic Acid</i> "
SCF	do inglês " <i>Stem Cells factor</i> "
SOCS 1	do inglês " <i>Supressor of Cytokine Signaling 1</i> "
T regs	T reguladoras
TGF-β	do inglês " <i>Transforming Growth Factor Beta</i> "
Th1	do inglês " <i>T helper 1</i> "
Th2	do inglês " <i>T helper 2</i> "
TLR	do inglês " <i>Toll-like receptors</i> "
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TPO	Trombopoietina
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
VCAM-1	do inglês " <i>Vascular Cell Adhesion Molecule 1</i> "
B-EP	Peptídeo Opióide Beta-endorfina
µg	micrograma
µL	microlitros

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Contagem global de leucócitos na cavidade peritoneal após inoculação de *S. aureus*, em camundongos, em diferentes tempos após receberem por gavagem, 7mg/g de peso de etanol ou água.....37
- Figura 2:** Análise de regressão em função do tempo da contagem de leucócitos na cavidade peritoneal de camundongos após receberem por gavagem, etanol (7mg/g) ou água.....38
- Figura 3:** Número de neutrófilos na cavidade peritoneal 6h após inoculação de *S. aureus* em camundongos, em diferentes tempos, após receberem por gavagem, 7mg/g de peso de etanol ou água.....39
- Figura 4:** Análise de regressão em função do tempo da contagem de neutrófilos na cavidade peritoneal de camundongos após receberem por gavagem, etanol (7mg/g) ou água.....40
- Figura 5:** Número de mononucleares na cavidade peritoneal 6h após inoculação de *S. aureus* em camundongos, em diferentes tempos após receberem por gavagem, 7mg/g de peso de etanol ou água.....40
- Figura 6:** Resultado da contagem de unidades formadoras de colônias de *S. aureus* no lavado peritoneal, 6h após a inoculação, após a administração por gavagem, etanol (7mg/g) ou água.....42
- Figura 7:** Resultado da avaliação do peso do timo em camundongos suíços fêmeas que receberam por gavagem, etanol na dose de 7mg/g de peso corporal.....42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resultados da contagem global de leucócitos em diferentes tempos após administração por gavagem, etanol (7mg/g) ou água.....37

Tabela 2: Resultados da contagem de neutrófilos em diferentes tempos após administração por gavagem, etanol (7mg/g) ou água.....39

Tabela 3: Resultado da contagem de unidades formadoras de colônias de *S. aureus* no lavado peritoneal, 6h após a inoculação, após a administração por gavagem, etanol (7mg/g) ou água.....41

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 EFEITOS DO ETANOL SOBRE COMPONENTES DA RESPOSTA IMUNITÁRIA INATA.....	14
2.1.1 Efeitos do etanol sobre receptores TLR.....	15
2.1.2 Efeitos do etanol sobre células endoteliais	16
2.1.3 Efeitos do etanol sobre fagócitos	18
2.1.4 Efeitos do etanol sobre a produção de intermediários reativos do oxigênio	20
2.1.5 Efeitos do etanol sobre células dendríticas.....	21
2.1.6 Efeitos do etanol sobre citocinas inflamatórias	22
2.1.7 Efeitos do etanol sobre células citotóxicas naturais (<i>Natural Killer Cells- NK</i>).....	23
2.2 EFEITOS DO ÁLCOOL SOBRE A RESPOSTA IMUNITÁRIA ADAPTATIVA..	25
2.2.1 Efeitos do etanol sobre linfócitos T	25
2.2.2 Efeitos do etanol sobre linfócitos B.....	27
2.2.3 Efeitos do etanol sobre citocinas imunoreguladoras.....	28
2.2.4 Considerações finais sobre os efeitos do etanol nas respostas imunitárias inata e adaptativa	29
3. OBJETIVOS	31
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1 ANIMAIS UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS	32
4.2 OBTENÇÃO DA CEPA DE <i>Staphylococcus aureus</i>	32
4.3 PREPARO DA SUSPENSÃO DE <i>Staphylococcus aureus</i>	32
4.4 INDUÇÃO DA INTOXICAÇÃO ALCOÓLICA AGUDA.....	33
4.5 INDUÇÃO DA PERITONITE	33
4.6 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	34

4.7 CONTAGEM GLOBAL E DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS NO LAVADO PERITONEAL	355
4.8 DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS (UFC) NO LAVADO PERITONEAL	355
4.9 AVALIAÇÃO DO PESO DO TIMO.....	36
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	36
5. RESULTADOS.....	37
6. DISCUSSÃO	43
7. CONCLUSÃO	48
8. REFERÊNCIAS.....	49

1. INTRODUÇÃO

O consumo do álcool etílico esteve presente como costume desde a antiguidade. Registros arqueológicos revelam que os primeiros indícios sobre a sua ingestão pelo ser humano datam de aproximadamente 6000 a.C. (CEBRID, 2003).

A partir da Revolução Industrial (século XVIII), registrou-se grande aumento na oferta de bebida alcoólica, contribuindo para um maior consumo e, conseqüentemente, um aumento no número de pessoas que passaram a apresentar algum tipo de problema decorrente do uso excessivo do álcool (CEBRID, 2003). Somente no século XIX, o alcoolismo começou a ter aceitação científica como doença, em seu conceito mais amplo, como entidade clínica, física e mental (REGINATO e MORAES-FILHO, 1986).

O alcoolismo é um dos maiores problemas de saúde pública no mundo. Sua dependência é uma doença complexa envolvendo fatores biológicos, psicossociais e ambientais. De acordo com dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), aproximadamente 2 bilhões de pessoas consomem bebidas alcoólicas. Seu uso indevido é um dos principais fatores que contribuem para a diminuição da saúde mundial, sendo responsável por 1,8 milhões de mortes (3,2% do total de mortes) e por 4% de todos os anos perdidos de vida útil. No Brasil estimou-se que, em 2005, 12,3% da população era dependente do álcool (BRASIL, 2009).

Uma variedade de danos à saúde pode estar relacionada ao uso do etanol, sendo alguns deles bem conhecidos como: hepatopatia alcoólica, pancreatite, cardiopatias, lesões no SNC e Neoplasias (HAKULINEN et al., 1974; LUNDY et al., 1974; GRAMENZI et al., 2006).

Complicações infecciosas decorrentes do consumo de álcool são descritas na literatura desde 1785 (SMITH; PALMER, 1976). Enquanto a má nutrição, deficiência vitamínica e cirrose hepática podem contribuir para deficiência imunitária, estudos em humanos e animais têm demonstrado que o consumo do álcool de forma aguda ou crônica, por si só, pode comprometer a resposta imunitária em diversas etapas, e esta imunomodulação decorre tanto de alterações nos mecanismos imunitários

inatos, como do comprometimento da imunidade celular e humoral (HALLENGREN; FORSGREN, 1978; BJÖRKHOLM, 1980; SZABO, 1999). O resultado é o aumento da susceptibilidade do alcoolista a uma série de doenças infecciosas, tais como tuberculose, pneumonias bacterianas, AIDS, hepatites B e C, além de infecções como peritonite bacteriana, bacteremia espontânea, dentre outras (CORREIA; CONN, 1975; SMITH; PALMER, 1976; MACGREGOR et al. 1986; ; CONN, 1998; SZABO, 1999; LEDERER et al., 2006; SAMET et al., 2007; BREITMEIER et al. 2008; BAUM et al., 2010).

Embora os mecanismos pelos quais a exposição excessiva ao álcool deprime o sistema imunitário não estejam completamente compreendidos, a administração aguda ou crônica do álcool, *in vivo* e *in vitro*, tem sido implicada com uma variedade de efeitos no sistema imune, incluindo vários sinais de imunossupressão (NAIR et al., 1990; MILI et al., 1992; SZABO et al., 1995b). De fato, muitos pesquisadores admitem que o etanol atue como modulador das respostas imunes inata e adaptativa, com influência sobre as funções das células fagocitárias, citocinas e mediadores inflamatórios, as atividades das células NK, sistema complemento, células apresentadoras de antígenos, linfócitos B e a desregulação e diminuição dos níveis das células T (KAPLAN, 1986; WATSON et al., 1988; CHANG; NORMAN; MAKINODAN, 1990; CHEN et al., 1993; COOK, 1998; TAMURA et al., 1998; ARBABI et al., 1999; GREENBERG et al., 1999; SZABO 1999; DIAZ et al., 2002; BROWN et al., 2006; SZABO; MANDREKAR, 2009).

A compreensão dos efeitos imunossupressores da exposição aguda ao álcool sobre a migração de leucócitos ainda é limitada. Embora existam na literatura muitos estudos, com modelos *in vitro* e *in vivo* (em humanos e animais), relacionados ao efeito da intoxicação alcoólica aguda sobre a quimiotaxia de neutrófilos (KLEPSEK; NUNGESTER, 1939; PHELPS; STANISLAW, 1969; GLUCKMAN; MACGREGOR, 1978; KAWAKAMI et al., 1991), seus resultados são controversos. Além disso, poucos avaliaram a relação entre o tempo de exposição ao etanol e alterações na quimiotaxia de leucócitos em resposta a um agente infeccioso.

Usando modelo animal de inflamação (modelos da bolsa de ar no dorso de camundongos), Saeed e colaboradores (2004) analisaram, entre outros fatores, o efeito do tempo de administração do etanol (em concentração suficiente para

intoxicação aguda - 5g/Kg) sobre o recrutamento de leucócitos. Os resultados mostraram que o efeito inibitório do álcool sobre a migração de leucócitos para o sítio inflamatório foi tempo-dependente. Apesar do modelo de carragenina ser bem estabelecido para o estudo de recrutamento celular em resposta à inflamação, ele pode não simular o processo de migração de células imunitárias durante uma infecção.

No estudo de Pruett e colaboradores (2010) a administração do etanol em camundongos, 30 minutos antes da infecção com *Escherichia coli* (injetada intraperitonealmente para produzir sepse), diminuiu a produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas durante várias horas. A porcentagem de células fagocitárias (macrófagos e neutrófilos) aumentou ao longo do tempo nos camundongos controle. O mesmo não foi observado nos camundongos tratados com etanol. Além disso, as bactérias presentes na cavidade peritoneal diminuíram ao longo do tempo no grupo controle e foram eliminadas com 21 h de infecção. Já no grupo dos camundongos tratados com etanol, o número de bactérias aumentou ao longo desse tempo.

Apesar de não haver dúvida que o etanol atue como modulador do sistema imunitário favorecendo a instalação e progressão de algumas doenças infecciosas, alguns aspectos desse efeito não estão bem esclarecidos, especialmente em relação às doses ingeridas necessárias para comprometer negativamente a resposta imunitária e o tempo de duração de duração desse efeito após a ingestão aguda do etanol.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A reação imunitária é uma resposta complexa que o organismo monta para reconhecer e tentar eliminar componentes estranhos, que nele penetra. Tal resposta é realizada pelo sistema imunitário que é formado pela medula óssea, linfonodos, baço, timo, tecido linfóide associado a mucosas e tecido linfóide associado à pele.

A resposta imunitária tem dois ramos básicos, aparentemente distintos, mas intimamente interligados: resposta imunitária inata e resposta imunitária adaptativa. A resposta inata inclui mecanismos defensivos que atuam imediatamente após uma agressão, respondendo de modo inespecífico a diferentes agressores e é representada por fagócitos (PMN, macrófagos e eosinófilos), basófilos, células citotóxicas naturais, mastócitos e sistemas proteolíticos de contato. A resposta imunitária adaptativa constitui reação a uma agressão com montagem de uma resposta particular, e neste sentido ela é mais eficiente contra o agente que a evocou (antígeno). Dessa interação surge uma resposta que pode ser efetuada por: (1) produção de anticorpos (resposta humoral); (2) produção de células T sensibilizadas capazes de atuar diretamente sobre o antígeno ou de recrutar outras células que procuram eliminar o antígeno; (3) incapacidade de produzir anticorpos e/ou células efetoras por mecanismos ativos ou não, denominada tolerância imunológica.

Todavia, esse orquestrado mecanismo de defesa contra patógenos pode ser prejudicado pela ação de agentes exógenos que afetam um ou mais componentes desse sistema. O álcool etílico tem sido descrito como um agente modulador do sistema imunitário e pode interferir em ambos os ramos da resposta imunitária, desde o reconhecimento dos epítopos até a efetuação da resposta (SZABO, 1999);

2.1 EFEITOS DO ETANOL SOBRE COMPONENTES DA RESPOSTA IMUNITÁRIA INATA

2.1.1 Efeitos do etanol sobre receptores TLR

Quando o organismo sofre a ação de qualquer agressão o primeiro evento para que possa haver a montagem de uma resposta defensiva é o reconhecimento da existência dessa agressão pelas alarminas (moléculas sinalizadoras da existência da agressão; PAMP, nos patógenos e DAMP gerados nos tecidos) (PEREIRA, 2011). Os PAMP e DAMP ativam a resposta imunitária inata, por interação com diferentes receptores conhecidos como receptores de reconhecimento de padrões moleculares (RRP), dentre os quais destaca-se a família dos receptores Toll-like (TLRs). Esses receptores estão presentes principalmente em macrófagos, neutrófilos e células dendríticas (MEDZHITOV; PRESTON-HURLBURT; JANEWAY, 1997) e após sofrerem estimulação, iniciam uma cascata de eventos de sinalizações intracelulares que conduzem a respostas pró-inflamatórias (AKIRA; SATO, 2003; TAKEDA; KAISHO; AKIRA, 2003). Exemplos de TLRs incluem TLR4, que reconhece LPS a partir de bactérias Gram-negativas; TLR3, o qual é ativado por RNA viral, ou TLR9, que é estimulado por DNA bacteriano não metilado (TAKEDA; KAISHO; AKIRA, 2003).

Vários estudos tem demonstrado que o etanol modifica a expressão de TLRs e/ou respostas mediadas por TLRs. Trabalhos *in vitro*, por exemplo, têm mostrado que o etanol inibe a sinalização via TLR4 em monócitos ou macrófagos (YAMASHINA et al., 2000; MANDREKAR; BELLEROSE; SZABO, 2002). Nishiyama e colaboradores (2002) relataram que uma dose única de etanol (5g /kg de peso corporal, administrado via intragástrica) reduziu a expressão de RNAm do TLR4 no fígado de camundongos entre 2 e 6 horas após o tratamento com etanol. Diversos mecanismos efetores da resposta imunes inata, induzidos por meio de TLR3, também foram suprimidos em camundongos após uma única dose de etanol (PRUETT et al., 2003; 2004a).

Em contraste, administração crônica de etanol (com duração de 3 e 4 semanas) parece levar ao aumento dos níveis de TLR4 nas células de Kupffer (ZUO et al., 2003). Em outro estudo, um aumento na expressão do RNAm de TLR1, 2, 4, 6, 7, 8 e 9, foi detectado em tecido do fígado de camundongos alimentados, durante 10

dias, com uma dieta contendo etanol (em média 139,1 mg/dL nível de etanol no sangue) (GUSTOT et al., 2006).

É importante ressaltar ainda que o álcool parece exercer efeitos diferentes sobre a ativação de células pró-inflamatórias de acordo com os sinais induzidos pela ativação dos TLRs. No estudo realizado por Oak e colaboradores (2006) o tratamento agudo com álcool inibiu seletivamente as vias pró-inflamatórias após indução por LPS (ligante de TLR4). O mesmo não aconteceu após estimulação com peptidoglicano (ligante de TLR2). Entretanto, em monócitos estimulados com a combinação dos ligantes de TLR2 e TLR4, o álcool exerceu efeito contrário, ou seja, aumentou a resposta inflamatória.

2.1.2 Efeitos do etanol sobre células endoteliais

As células endoteliais desempenham um papel importante na defesa do hospedeiro. A expressão de moléculas de adesão (por exemplo, E-selectina, ICAM-1 e VCAM-1), de citocinas (IL-1, TNF alfa) de quimiocinas (IL-8), entre outras, por essas células contribui para o extravasamento de leucócitos em tecidos que sofrem qualquer tipo

de agressão. As células endoteliais também são uma fonte importante de fatores de crescimento da linhagem mielóide, tais como G-CSF, GM-CSF, M-CSF, trombopoietina (TPO) e SCF, que são liberados em resposta à estimulação com LPS, IL-1, ou outros agentes (KOENIG et al., 1994; LENHOFF; OLOFSSON, 1996; CARDIER; DEMPSEY, 1998; FIXE; PRALORAN, 1998).

Estudos *in vitro* (com células humanas ou de animais de laboratório) e *in vivo* (em modelos experimentais) demonstraram que a intoxicação alcoólica aguda é capaz de interferir nas funções do endotélio e com isso, tornar a adesão de granulócitos prejudicada (MACGREGOR; SPAGNUOLO; LENTNEK, 1974; BUCKLEY; VENTURA; MACGREGOR, 1978; GLUCKMAN; MACGREGOR, 1978). Na tentativa de entender os mecanismos pelos quais isso ocorre, Jonsson e Palmblad (2001) buscaram avaliar *in vitro* os efeitos do etanol (0,01%-1%) sobre a produção de fatores de crescimento mielóides, por células endoteliais da veia umbilical humana

(HUVECs), e sobre a interação dessas células com os neutrófilos. Os resultados mostraram que o etanol inibiu, de forma dose-dependente, a liberação de G-CSF, GM-CSF e IL-8 induzida por LPS, pelas HUVECs. Também inibiu a liberação de G-CSF induzida pela IL-1 β e de SCF induzida pela IL-1 α por essas células. A inibição desses fatores pelo etanol foi acompanhada por efeitos inibitórios sobre a translocação nuclear de NF- κ B e a capacidade das HUVECs em se ligarem aos neutrófilos. Por outro lado, a liberação de M-CSF induzida por LPS e a expressão de ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina de superfície, em HUVECs, não foram afetadas pelo etanol, neste estudo. Essas observações foram confirmadas por Saaed e colaboradores (2004), *in vitro* e *in vivo*, utilizando doses de etanol próximas das encontradas no sangue de humanos com alcoolismo agudo.

Esses resultados suportam a hipótese de que a exposição aguda de etanol pode aumentar o risco de infecções, em parte, ao bloquear a ativação das células endoteliais e subsequentes interações leucócitos - células endoteliais, necessárias para o recrutamento de células do sistema imunitário eficientes para o sítio de infecção (SAEED et al., 2004).

A exposição crônica ao álcool, ao contrário do observado na exposição aguda, parece induzir o aumento da expressão de moléculas de adesão na superfície do endotélio. Sacanella e Estruch (2003) mostraram que alcoolistas crônicos exibem níveis séricos significativamente elevados de moléculas de adesão endotelial quando comparados aos consumidores moderados de álcool e aos indivíduos em abstinência alcoólica. Além disso, esses investigadores também detectaram um aumento da expressão de E-selectina, ICAM-1 e VCAM-1 em biópsias hepáticas de pacientes com hepatite alcoólica e cirrose.

Da mesma forma, Das e colaboradores (2010), após submeterem ratos Wistar ao tratamento crônico com álcool, observaram que a expressão de ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1 foi induzida nas células endoteliais do fígado desses animais. ICAM-1 e PECAM-1 foram significativamente expressas após quatro semanas de exposição ao etanol, enquanto VCAM-1 foi significativamente expressa após 12 semanas de exposição, em comparação ao grupo controle. Tais resultados sugerem que o aumento da expressão de moléculas de adesão pode estar associado com o início das lesões hepáticas durante a intoxicação alcoólica crônica.

2.1.3 Efeitos do etanol sobre fagócitos

Durante a resposta inflamatória, macrófagos e neutrófilos exercem papel central na localização, fagocitose e eliminação de microrganismos. Trata-se de um mecanismo complexo que envolve o recrutamento de células fagocitárias da corrente sanguínea para o sítio inflamatório pelos agentes quimiotáticos, a citar os componentes do sistema complemento (C5a), leucotrienos (LTB₄) e várias proteínas da família das quimiocinas. A migração de neutrófilos e de monócitos para sítios de inflamação envolve a aderência e passagem através do endotélio vascular, posterior fagocitose e destruição intracelular de patógenos por enzimas proteolíticas ou via liberação de radicais do oxigênio (SPRINGER, 1995). Achados na literatura tem mostrado que as alterações nessas células, pelo álcool, podem contribuir para lesão hepática alcoólica, além de aumentar a susceptibilidade do hospedeiro às infecções.

Redução da exsudação de leucócitos na pele no local onde se inoculou pneumococo em coelhos ou camundongos alcoolizados foi relatada há bastante tempo, embora sem referência à duração do efeito (PICCRELL, 1938, citado BOÉ et al, 2001) Observação semelhante foi feita na pele de humanos utilizando a janela de Rebuck (LOURIA, 1963, citado em SHELLITO et al 2001; BRAYTON et al 1970). Brayton e colaboradores (1970) ao realizarem o teste da janela de pele de Rebuck em pacientes normais e alcoolizados (com níveis sanguíneos de álcool de 160-180mg%), observaram que nos pacientes alcoolizados o número de neutrófilos estava 500 vezes abaixo dos níveis normais após 2 horas de administração do etanol. Esta redução na migração de PMN não foi observada em alcoolistas crônicos com níveis subtóxicos de álcool ou em pacientes com cirrose. O estudo realizado por Zhang e colaboradores (1997) com camundongos mostrou que a exposição aguda de etanol não só inibiu o recrutamento de PMNs no pulmão, induzido por endotoxina intratraqueal, mas também bloqueou a sua ativação, medida pela redução da expressão de CD11b/c.

Estudos *in vivo*, realizados para determinar os efeitos do consumo crônico de álcool sobre as células de Langerhans e migração das células dendríticas do derma, mostraram diminuição no número dessas células, além de migração retardada das

mesmas para o linfonodo (LASO et al., 2007; NESS et al., 2008). Estes resultados podem parcialmente explicar porque alcoolistas crônicos são mais suscetíveis a infecções, especialmente àquelas desencadeadas após penetração da pele (NESS et al., 2008).

Os estudos sobre o efeito do álcool agudo na quimiotaxia de granulócitos, *in vitro*, apresentam resultados controversos na literatura. Enquanto alguns experimentos demonstraram diminuição da quimiotaxia de neutrófilos, *in vitro*, após pré-incubação dos leucócitos com baixas concentrações de álcool (KLEPSEK; NUNGESTER, 1939; PHELPS; STANISLAW, 1969), outros estudos observaram redução da resposta quimiotática apenas em concentrações superiores às observadas clinicamente (CROWLEY; ABRAMSON, 1971; SPAGNUOLO; MACGREGOR, 1975; HALLENGREN; FORSGREN, 1978).

O consumo crônico de álcool, em contrapartida, tem sido associado com um aumento da infiltração de leucócitos polimorfonucleares no fígado, evento que pode contribuir para o desenvolvimento de doença hepática alcoólica. Se admite que metabólitos do etanol são capazes de ativar células de Kupffer a produzir fatores quimiotáticos (quimiocinas) para neutrófilos, aumentando a exsudação dessas células para o órgão (PEREZ et al., 1984; ROLL et al., 1989; 1991; BAUTISTA et al., 1992 ; FAINSLBER et al., 1988; BAUTISTA, 1995;1997;MALTBY et al., 1996).

Os efeitos do álcool sobre a fagocitose começaram a ser avaliados a partir de 1960 e 70 e também apresentaram resultados discordantes. O estudo realizado por Louria (1963) mostrou que o álcool reduziu, *in vitro*, a capacidade de fagocitose e morte intracelular de bactérias em leucócitos mononucleares e polimorfonucleares. Guarneri e Laurenzi (1968) também relataram efeitos deletérios do álcool sobre a função fagocítica de macrófagos em cultivo celular. Esses mesmos investigadores, ao realizarem experimentos com camundongos alcoolizados, mostraram reduzida capacidade dos macrófagos alveolares em eliminarem estafilococos administrados via aerossol (LAURENZI; GUARNERI, 1966). Em contraste, no estudo *in vitro* de Brayton e colaboradores (1970), não foi observado nenhuma redução na capacidade de fagocitose e de morte intracelular em leucócitos após exposição a 2-4g/L de

álcool. Hallengren e Forsgren (1978), em seus estudos com a técnica de emulsão em óleo, só encontraram uma significativa redução da fagocitose e da capacidade de morte intracelular de bactérias por leucócitos, nas concentrações acima de 6,4g/L de álcool, e portanto, em concentrações que não podem ser observadas em humanos com alcoolismo agudo.

A ingestão crônica de etanol também se mostrou associada à diminuição da viabilidade de macrófagos alveolares, bem como de sua capacidade de fagocitar microrganismos. Estes resultados podem explicar o aumento do risco de pneumonia em alcoolistas crônicos (BROWN et al., 2004). Outro estudo mostrou que a redução da fagocitose de macrófagos alveolares, após a exposição crônica ao etanol, é devido à diminuição da expressão do receptor de membrana para GM-CSF (JOSHI et al., 2005). As células de Kupffer e macrófagos peritoneais murinos, quando expostas cronicamente ao etanol, também apresentaram redução da fagocitose e da atividade bactericida (GALANTE et al., 1982; SHIRATORI et al, 1989a; 1989b; CASTRO et al., 1993).

É interessante notar aqui que a dicotomia entre a exposição aguda e crônica ao etanol não é observada na fagocitose. Ambos os tipos de exposição ao álcool geralmente diminui a fagocitose. A tarefa atual consiste em elucidar os mecanismos pelos quais o álcool exerce esse efeito.

2.1.4 Efeitos do etanol sobre a produção de intermediários reativos do oxigênio

Radicais reativos do oxigênio, produzidos por meio da explosão oxidativa em macrófagos e neutrófilos ativados, desempenham um papel crucial na destruição de microrganismos, especialmente nos pulmões (SZABO, 1999).

Estudos demonstraram que macrófagos alveolares de ratos alcoolizados tanto de forma aguda quanto crônica apresentam redução na produção de ânions superóxidos e peróxidos de hidrogênio (ANTONY et al., 1993; LIBON et al., 1993).

A inibição *in vitro* pelo etanol da formação de radicais reativos do oxigênio por PMNs e monócitos do sangue, após desafio com LPS ou outros agentes estimuladores que atuam por ligação aos receptores de superfície, também foi evidente (SCHOPF et al., 1985; NILSSON; PALMBLAD et al., 1988; PARLESACK et al., 1998). Em adição, foi demonstrado que a administração intravenosa de etanol em coelhos levou à redução no metabolismo oxidativo de PMNs durante a indução de uma sinovite na articulação do joelho desses animais (NILSSON et al., 1995). Dessa forma, a redução na produção dos intermediários reativos do oxigênio por macrófagos e PMNs, após exposição ao álcool, pode ser um dos mecanismos para debilitação das defesas imunes do hospedeiro.

Por outro lado, a superprodução de radicais livres de oxigênio no fígado, induzida pelo álcool, já foi relatada e pode contribuir para o desenvolvimento de lesão hepática alcoólica (HOEK; PASTORINO, 2002; JAESCHKE et al., 2002). Em ratos que receberam infusões de álcool por 1, 3 ou 5 horas, as células de Kupffer foram estimuladas a secretar níveis aumentados de superóxido (SPITZER; BAUTISTA, 1993).

Essas observações sugerem que o álcool pode ter efeito antagônico sobre a produção de radicais reativos do oxigênio no hospedeiro.

2.1.5 Efeitos do etanol sobre células dendríticas

As células dendríticas são as células do sistema imune inato mais eficientes em desencadear e direcionar respostas imunes adaptativas mediadas por linfócitos T. Essa capacidade reflete a habilidades das células dendríticas de internalizar antígenos proteicos microbianos, transportá-los aos gânglios linfáticos, onde serão apresentados aos linfócitos T virgens, e levar à ativação dessa população celular, desencadeando o início de uma resposta imune específica efetiva (ABBAS, 2011).

Dados na literatura mostram que as células dendríticas possuem aspectos fenotípicos e funcionais influenciados negativamente pela exposição aguda e crônica ao etanol, tanto em seres humanos (DOLGANIUC et al, 2003; MANDREKAR et al, 2004; LASO et al, 2007) quanto em camundongos (ALOMAN et al., 2007; HEINZ; WALTEBAUGH, 2007; LAU et al, 2006; NESS et al, 2008). Em adição, foi demonstrada uma diminuição da capacidade das células dendríticas para ativar e estimular a proliferação de células T. Tal evento ocorre devido à deficiência da expressão das moléculas co-estimuladoras B7.1, B7.2, CD40, CD80, CD86, bem como à secreção anormal da citocinas (SZABO, et al., 2004b; ALOMAN et al., 2007), causadas pelo etanol.

Além de comprometer a função das células dendríticas, a exposição prolongada ao etanol (8 dias) parece interferir na geração de precursores de células dendríticas mielóides (LAU et al., 2006). Uma diminuição seletiva da população de células dendríticas mielóides foi observada no sangue de pacientes considerados alcoolistas crônicos (LASO et al., 2007) e no sangue de macacos expostos ao etanol (SIGGINS et al., 2009). Em estudos *in vitro* e *in vivo* sobre o efeito do álcool em células dendríticas mielóides, obtidas a partir de indivíduos saudáveis, Mandrekar e colaboradores (2004) demonstraram que a exposição aguda do álcool também prejudica a diferenciação das células dendríticas. Alterações no número dessas células podem contribuir para as respostas imunitárias comprometidas pela falta de interações suficientes, durante a apresentação de antígenos, com as células T (DOGANILC et al., 2003; MANDREKAR et al., 2004; SZABO et al., 2004a; LAU; ABE; THOMSON, 2006) ou pelo aumento da indução de células T reguladoras (Treg) (EDSEN-MOORE et al., 2008).

2.1.6 Efeitos do etanol sobre citocinas inflamatórias

Os dados da literatura mostram resultados aparentemente discordantes em relação ao efeito do etanol sobre a produção de citocinas próinflamatórias, conforme a exposição seja aguda ou crônica

O consumo agudo e moderado de álcool transitoriamente parece ter efeito supressor sobre a produção das quimiocinas MIP-2 e CINC e das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 e IL-6, por monócitos ou macrófagos, em resposta a vários antígenos, tanto *in vitro* (CHEN et al., 1993; VERMA et al., 1993; SZABO et al., 1995a, b; 1996; ZHANG et al., 2002) quanto *in vivo* (NELSON et al., 1989; KOLLS et al., 1995; STOLTZ et al., 2000; BOÉ et al., 2001; GORAL; CHOUDNHRY; KOVACS, 2004). Níveis insuficientes de citocinas pró-inflamatórias pode explicar a inibição da quimiotaxia de neutrófilos *in vivo* (ARBABI, et al., 1999), bem como dificultar as interações entre as células linfoides e endoteliais, o que poderia resultar no recrutamento inadequada de células linfoides para os locais de inflamação (SAEED et al., 2004).

Em contrapartida, vários estudos em humanos e animais têm mostrado que o consumo crônico de álcool está associado com aumento das concentrações séricas de TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, MIP-2 e MCP-1 (MCCLAIN; COHEN, 1989; KHORUTS et al., 1991; BAUTISTA, 1997; MCCLAIN, 1998; TAÏEB et al., 2002). Os níveis aumentados dessas citocinas podem contribuir para a maior parte dos sinais e sintomas observados em pacientes com hepatite alcoólica - por exemplo, metabolismo aumentado, febre, perda de peso, diminuição da albumina sérica, e os marcadores de desnutrição (MCCLAIN; COHEN, 1989). Além disso, a exposição crônica ao etanol sensibiliza os hepatócitos para os danos provocados por TNF- α (HINES; WHEELER, 2004) e, assim, as células tornam-se mais suscetíveis a apoptose. Há evidências que o abuso de álcool está ligado á maior prevalência de infecção com vírus da hepatite. Por isso, tem sido proposto que as infecções virais podem servir como cofatores para o desenvolvimento de fibrose hepática (REGEV; JEFFERS, 1999). Mecanismos semelhantes, que resultam em inflamação e fibrose podem ocorrer também no pâncreas de alcoolistas crônicos (APTE et al., 2000; JERRELLS et al., 2007).

2.1.7 Efeitos do etanol sobre células citotóxicas naturais (*Natural Killer Cells-NK*).

As células NK são um tipo de linfócitos distintos dos linfócitos T e B, responsáveis pela destruição de células infectadas por vírus, ativação de macrófagos para destruição de microrganismos fagocitados e pela prevenção do desenvolvimento de tumores e metástase (HERCEND; SCHMIDT, 1988; ABBAS, 2011).

Estudos em camundongos e ratos têm geralmente demonstrado que o efeito do álcool sobre a atividade das células NK depende muito de fatores como o estado nutricional, linhagem genética específica, idade, exercício, quantidade e tempo de administração do álcool (COOK et al. 1997, LI et al, 1997). No entanto, apesar da existência de algumas inconsistências, a maioria dos estudos com animais indica que tanto o consumo agudo quanto a exposição crônica ao etanol parecem diminuir a atividade citotóxica das células NK (BLANK et al., 1993; WU; PRUETT, 1994; BEN-ELIYAHU et al., 1996; WU; PRUETT, 1996). Estudos em humanos também mostraram redução nas funções das células NK após a administração do álcool (IRWIN et al., 1990; BOUNDS et al., 1994; COOK et al., 1997). O mecanismo pelo qual o etanol altera a função da célula NK, entretanto, ainda não é conhecido. Boyadijeva e colaboradores (2001) fornecem a evidência de que a inibição da atividade citolítica das células NK, induzida pelo etanol, pode ser em parte devido à redução dos níveis de β -EP (peptídeo opióide β -endorfina), que tem entre outras funções, a regulação da atividade das células NK. Em adição, Dokur e colaboradores (2003) mostraram que a administração de etanol suprime a atividade citolítica de células NK em ratos Fischer machos, diminuindo a produção e/ou atividade de granzima B, perforinas, e IFN- γ .

Uma observação feita em relação à população de células NK, tanto em animais quanto em humanos, foi que consumo agudo ou crônico de etanol foram capazes de reduzir a porcentagem de células NK circulantes (BLANK et al, 1993;. WU; PRUETT, 1994; COOK et al., 1997; PERCIVAL; SIMS, 1999; BALLAS et al., 2012).

Uma vez que o álcool pode reduzir o número de células NK e sua atividade, vários estudos compararam a proliferação de tumores experimentais em animais com e sem exposição contínua do álcool. Algumas experiências sugeriram aumento da disseminação do tumor, presumivelmente mediada pela supressão de células NK induzida pelo álcool (YIRMIYA et al., 1992). Outros estudos, porém, utilizando um

modelo de tumor diferente, relataram a supressão da proliferação do tumor (MEADOWS et al., 1993). Alguns dados indicam que tanto a localização do tumor quanto a exposição prévia das células ao álcool são importantes para predizer se o álcool irá acelerar ou retardar a disseminação do tumor (BLANK; MEADOWS, 1996).

2.2 EFEITOS DO ÁLCOOL SOBRE A RESPOSTA IMUNITÁRIA ADAPTATIVA

2.2.1 Efeitos do etanol sobre linfócitos T

Estudos em modelos experimentais investigando linfócitos e subpopulações de linfócitos T têm demonstrado, de maneira geral, que o consumo agudo e crônico de álcool levam a depleção e disfunção dessas células no sangue periférico (LUNDY et al., 1975; SMITH et al., 1980; GLASSMAN; BENNETT; RANDALL, 1985; BAGASRA et al., 1987; SZABO, 1999). Em adição, a ingestão crônica de etanol também foi associada com uma diminuição *in vitro* e *in vivo* no tamanho e número de células T no timo, baço e linfonodos (JERRELLS et al., 1986; 1990a, b; SAAD; JERRELLS, 1991; PRUETT et al., 1994; GURUNG et al., 2009). O mecanismo subjacente à diminuição induzida pelo álcool do número de células T ainda é desconhecido. Mas alguns investigadores sugeriram que a exposição aguda ao álcool induz a morte celular programada (apoptose) de células T imaturas no timo, (HAN et al., 1993; EWALD; SHAO, 1993; KAPASI et al., 2003) e de linfócitos maduros e monócitos no sangue, por meio da ativação da via intrínseca ou mitocondrial (SZABO et al., 1995a). Na intoxicação etílica aguda há involução do timo, com redução dos linfócitos corticais, relacionados com o aumento dos níveis de corticosterona induzidos pelo estresse da intoxicação aguda e por ação do etanol (HAN et al., 1993 E 1995)

Além de um número reduzido de linfócitos, uma diminuição na proliferação celular também foi observada *in vitro* e *in vivo*, 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; GURUNG et al.,

2009). Como o álcool afeta a proliferação de células T não é bem compreendido. Jerrels e colaboradores (1990a) mostraram, em ratos alimentados cronicamente com álcool, que as células T não proliferam de forma adequada em resposta a estimulação por IL-2. Um efeito direto do álcool sobre a proteína quinase C (PKC) também foi sugerido como um possível mecanismo para defeitos na proliferação dos linfócitos T (SPINOZZI et al., 1991). Os resultados de outras investigações sugerem, ainda, que a diminuição na proliferação das células T pode ser uma consequência da disfunção das células acessórias (por exemplo, células apresentadoras de antígeno), bem como de citocinas imunomoduladoras derivadas de monócitos (TGF- β , IL-10), após consumo de álcool (SZABO; VERMA; CATALANO, 1993; PETERSON et al., 1998).

Estudos tem demonstrado, ainda, que a exposição crônica de linfócitos T ao etanol inibe a capacidade dessas células de liberar a citocina IL-17, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (SHELLITO et al., 2001). No estudo de Nelson e colaboradores (1991), os baixos níveis de IL-17 encontrados em camundongos exposto de forma aguda ao etanol, após desafio com *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*, foram associados ao recrutamento reduzido de neutrófilos no tecido pulmonar desses animais e, conseqüentemente, à maior susceptibilidade às infecções.

O número e a função das células T na hipersensibilidade tardia também são reduzidos em alcoolistas. Como resultado, a resposta imune a certos antígenos e infecções é deprimida. Experimentalmente, a incubação de linfócitos de pessoas normais em meio de cultura com álcool resulta em queda na atividade citotóxica e no movimento migratório desses linfócitos (LUNDY et al., 1975; SMITH; PALMER, 1976; BJÖRKHOLM, 1980). O comprometimento da hipersensibilidade tardia (reação do tipo IV na classificação de Gell e Coombs) foi também observado em camundongos alimentado cronicamente com etanol (PETERSON et al., 1998). Entretanto, é importante salientar que as alterações na função *in vivo* parecem estar associadas com a quantidade e a duração da administração de etanol. Há na literatura um único trabalho experimental que demonstrou aumento da resposta imunitária (medida por reação intradérmica) em ratos tratados com baixas doses de etanol e redução dessa resposta utilizando doses mais elevadas (MENDENHALL et al, 1997).

De modo geral, as anomalias imunológicas observadas após o consumo de álcool, tanto crônico quanto agudo, parecem ser consistentes com a diminuição da imunidade mediada por células (resposta do tipo Th1), caracterizada pela proliferação reduzida de células T, acompanhada por uma melhor imunidade humoral (resposta do tipo Th2), marcada por níveis elevados de anticorpos (como será discutido mais adiante). Esta mudança na resposta imune provavelmente prejudica a defesa do organismo contra infecções que exijam predominantemente uma resposta imune mediada por células (SZABO, 1999; STARKENBURG et al., 2001; OSTROVIDOV et al., 2002).

2.2.2 Efeitos do etanol sobre linfócitos B

Vários estudos tem demonstrado que os linfócitos B também são afetados pelo álcool. Estudos em seres humanos mostraram que enquanto a função das células B parece estar prejudicada em indivíduos alcoolistas, seu número absoluto não diferiu entre os alcoolistas e não alcoolistas (ROSELLE, 1992). Todavia, no estudo de Sacanella e colaboradores (1998) uma redução significativa das células B em alcoolistas crônicos foi observada. Da mesma forma, camundongos alimentados com álcool, por 14 dias, exibiram um número de células B no baço reduzido em 5X, em relação ao grupo controle. Vários estudos tem demonstrado que a exposição fetal ao etanol pode afetar o desenvolvimento de células B na medula óssea vermelha (WOLCOTT; JENNINGS; CHERVENAK, 1995; REIMOLD et al., 1996; BIBER et al., 1998; MOSCATELLO et al., 1999).

Ainda no estudo de Sacanella e colaboradores (1998), foi demonstrado que as células B dos camundongos alimentados com álcool tiveram proliferação reduzida em resposta a antígenos T-dependentes, mas proliferação normal durante uma resposta de células T-independente (JERRELS et al., 1993). Essa dicotomia entre as respostas das células B já havia sido demonstrada por Bagasra e colaboradores (1987), em ratos alcoolizados cronicamente e desafiados com antígenos de

pneumococo. Esses autores sugeriram que a perda de função e / ou depleção de células T auxiliares (T helper) e células T supressoras, provocadas pelo álcool, podem ser responsáveis pelas irregularidades na função das células B observada durante o alcoolismo crônico. A complexidade dos efeitos do álcool sobre as células B é ressaltada pela descoberta de que o álcool prejudica sua proliferação e a mudança de classe das imunoglobulinas quando induzidas pela citocina IL-4 liberada pelas células T (ALDO-BENSON et al., 1992b). Por outro lado, um outro estudo realizado por este mesmo pesquisador demonstrou *in vitro* que o álcool também tem efeito direto sobre os linfócitos B inibindo tanto a proliferação dessas células quanto a síntese de imunoglobulinas (ALDO-BENSON et al., 1992a).

Alterações nos nível de anticorpos (ou imunoglobulinas) no soro são características bem reconhecidas em alcoolistas crônicos (ROSELLE, 1992). Smith e colaboradores (1980) registraram um aumento dos níveis séricos de IgG, IgA e IgE e respostas melhoradas de anticorpos para antígenos de pneumococo, em pacientes com evidência histológica de danos no fígado. Em acordo, Drew e colaboradores (1984) relataram a ativação de célula B policlonal, em pacientes alcoólicos com nenhuma evidência de disfunção hepática. Em contrapartida, experiências *in vitro* têm demonstrado que doses fisiológicas de álcool podem suprimir a produção de anticorpos por meio de efeitos diretos sobre células B (ALDO-BENSON et al., 1986; 1989). Os mecanismos bioquímicos envolvidos nesta inibição não são claros, uma vez que, nestes estudos, o álcool não teve nenhum efeito aparente sobre as alterações intracelulares e de membrana que normalmente ocorrem quando as células B são estimuladas a produzir anticorpos. No estudo de Alonso e colaboradores (2012), realizado em camundongos, a administração de álcool não foi associada com alterações significativas nas concentrações séricas de IgA e IgM, e pareceu diminuir as concentrações de subclasses de IgG.

2.2.3 Efeitos do etanol sobre citocinas imunoreguladoras

A exposição aguda ao álcool parece contribuir para o aumento da produção de IL-10 em culturas de monócitos humanos, tanto na ausência quanto na presença de

estimulação por antígenos bacterianos e, assim, pode interferir com a interação normal das imunidades mediada por célula e humoral (MANDREKAR et al., 1996; SZABO, et al., 1996). Resultados semelhantes foram encontrados no estudo de D'Souza El-Guindy e colaboradores (2007), em camundongos intoxicados de forma aguda com etanol e desafiados com LPS. Nesse mesmo estudo, também foi demonstrado aumento dos níveis de TGF- β . Em experiências com culturas de monócitos, concentrações de álcool fisiologicamente relevantes induziram a produção TGF- β , independentemente da presença ou ausência de estimulação bacteriana (SZABO, et al., 1992).

Aumento na produção de TGF- β também foi encontrado em ratos e camundongos alimentados cronicamente com etanol (JÄRVELÄINEN et al., 1999; DAS et al., 2009; BROWN SD; BROWN LA, 2012) e em alcoolistas crônicos infectados pelos vírus da hepatite C (CASTELLANO-HIGUERA et al., 2008). Em contrapartida, estudos realizados em alcoolistas crônicos e em camundongos expostos de forma crônica ao etanol mostraram quantidades de IL-10 inferiores às normais, o que contribui para produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias (WANG et al., 1993; LE MOINE et al. 1995; HILL et al., 2002) Esses resultados, no entanto, parecem controversos. Valles e colaboradores (2003) ao estudarem o efeito da administração crônica do etanol sobre hepatócito, *in vitro*, observaram aumento da liberação de IL-10 nessas células. Resultados similares foram encontrados no estudo de Das e colaboradores (2009) após 12 semanas de tratamento de camundongos BALB/c com etanol.

2.2.4 Considerações finais sobre os efeitos do etanol nas respostas imunitárias inata e adaptativa

Os dados da literatura mostram, de modo geral, que a ingestão abusiva do etanol provoca alterações importantes nas respostas imunitárias inata e adaptativa, desde o reconhecimento das alarminas pela modificação na expressão de receptores como TLR, passando por alterações nos mecanismos de montagem das respostas e nos seus mecanismos efetadores. Os mecanismos efetadores da resposta imunitária

representam o que conhecemos como inflamação e há evidências de que o etanol tenha, de modo geral, efeitos antiinflamatórios. De fato, como visto em parágrafos anteriores o etanol altera a ativação e a expressão de moléculas de adesão em células endoteliais, havendo também indicações de que seus efeitos prejudicam a exsudação de leucócitos , especialmente neutrófilos e macrófagos. De modo geral, os estudos que utilizaram modelos experimentais estabelecidos para avaliação do efeito do etanol no recrutamento celular, produção de citocinas e quimiocinas, expressão de moléculas de adesão pelas células endoteliais e atividade de fagócitos mononucleares e polimorfonucleares em resposta à infecção, mostram redução da atividade microbicida e na capacidade de migrar (quimiotaxia). No entanto, poucos deles avaliaram a correlação entre o tempo de exposição ao etanol e a quimiotaxia frente a um desafio infeccioso. Considerando que uma intoxicação etílica aguda é fator de risco para pneumonites em humanos, fato comprovado em trabalhos experimentais, o objetivo da presente investigação é tentar estabelecer até quanto tempo após uma intoxicação aguda pelo etanol a exsudação de leucócitos, especialmente neutrófilos, permanece comprometida.

3. OBJETIVOS

- 1) Avaliar o tempo de duração do efeito de uma intoxicação aguda com etanol sobre a exsudação de neutrófilos em peritonite induzida por *Staphylococcus aureus* em camundongos.
- 2) Avaliar o número de bactérias na cavidade peritoneal de camundongos, seis horas após inoculação de *S. aureus* em diferentes tempos após a intoxicação etílica aguda.
- 3) Avaliar o peso do timo 24, 48, 96 e 120 horas após a intoxicação etílica aguda.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS

Foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6, fêmeas, de 8 a 10 semanas de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. Os animais foram atestados como isentos de doença infectocontagiosa ou parasitária.

Os animais receberam ração e água filtrada, *ad libitum*, e foram mantidos em um gabinete para biotério por pelo menos uma semana antes dos experimentos.

Para avaliar o efeito da intoxicação aguda do etanol como um agente produtor de estresse (agente estressador ou “*stressor*”) foram utilizados camundongos suíços, fêmeas, entre 6 e 8 semanas de idade.

4.2 OBTENÇÃO DA CEPA DE *Staphylococcus aureus*

Para realização deste estudo foi utilizada uma cepa padrão de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) obtida no Laboratório de Resistência Bacteriana da Universidade Federal do Espírito Santo.

4.3 PREPARO DA SUSPENSÃO DE *Staphylococcus aureus*

A cepa de *S. aureus* foi descongelada, repicada em meio ágar Müeller-Hinton e incubada por 24 horas a 37 °C em estufa (NAPCO® Microprocessor Controlled TC Water Jacket CO₂ Incubators Series 6500) com atmosfera contendo 5% de CO₂. Após o crescimento bacteriano, uma alça bacteriológica foi coletada da cultura e

suspensa em 3 mL de tampão fosfato (0,067M, pH 6,8) estéril, contido no interior de um tubo com pérolas de vidro. A suspensão foi agitada vigorosamente em um agitador mecânico. A partir dessa suspensão, foi feita outra suspensão com uma densidade ótica (DO) de 0,525 ($\pm 0,01$) a 625nm de modo a atingir uma concentração entre 6×10^8 - 9×10^8 UFC/mL.

Para confirmar a densidade bacteriana final do inóculo, a partir de uma alíquota de 100 μ L da suspensão foram realizadas diluições, em tampão fosfato, de 10, 100, 1000, 10000, 100000 e 1000000 vezes. Posteriormente, 20 μ L das diluições 10^4 , 10^5 e 10^6 foram plaqueados em meio ágar Müeller-Hinton. As placas foram vedadas em embalagens plásticas hermeticamente fechadas e incubadas por 24h a 37 °C em estufa.

Após o período de incubação, as colônias foram quantificadas com o auxílio de lupa em diluições com 10 a 100 colônias visíveis. O número de colônias na diluição escolhida foi, então, corrigido de acordo com a diluição e expresso em UFC/mL por meio da seguinte fórmula:

$$\text{UFC/mL do inóculo} = \text{n}^\circ \text{ colônias em } 20 \mu\text{L} \times 50 (1000 \mu\text{L}/20 \mu\text{L}) \times 1/\text{diluição}$$

4.4 INDUÇÃO DA INTOXICAÇÃO ALCOÓLICA AGUDA

A intoxicação etílica aguda foi feita pela administração de uma solução de etanol a 40%, por gavagem, com agulha metálica apropriada. Cada animal recebia etanol na dose 7mg/g de peso corporal. Os animais do grupo (controle) recebiam igual volume de água destilada (PRUETT et al., 2005).

4.5 INDUÇÃO DA PERITONITE

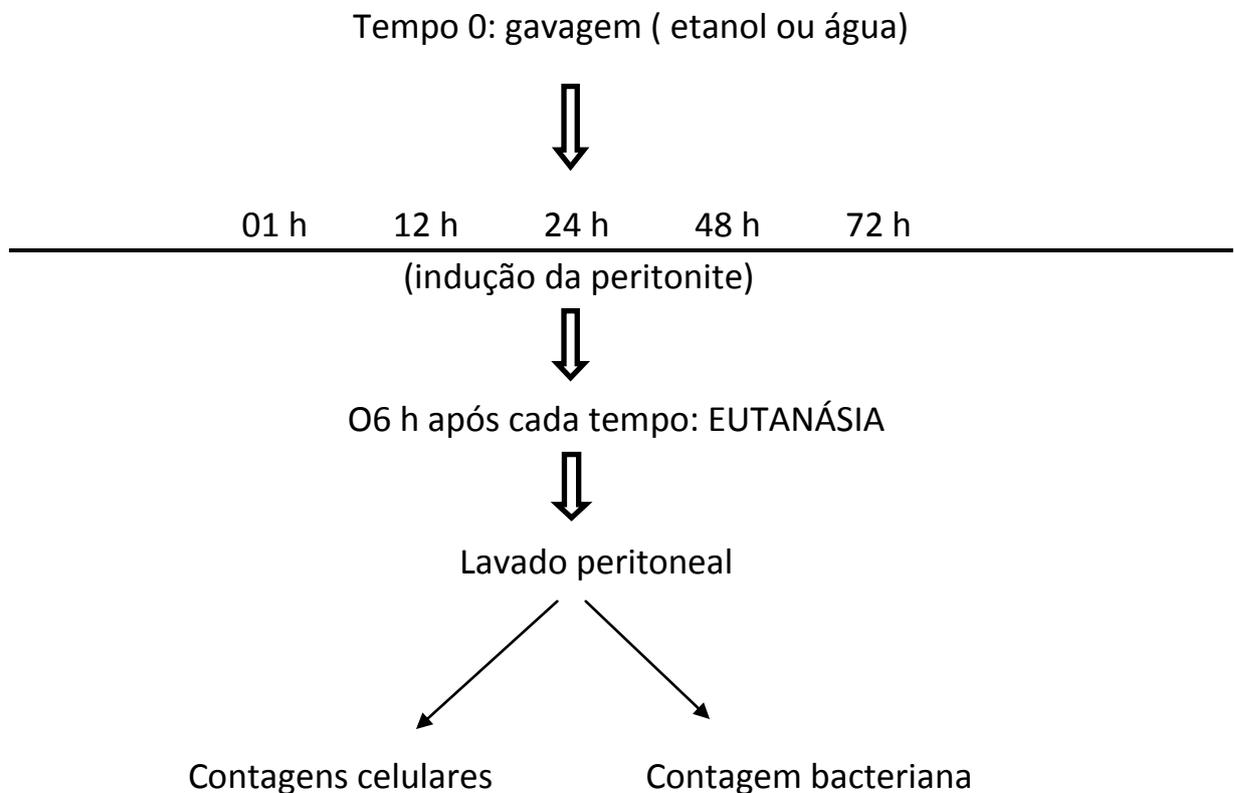
Três animais do grupo etanol e dois animais do grupo controle foram infectados com 500 μ L da suspensão de *S. aureus* contendo entre 6×10^8 e 9×10^8 UFC/ml, via

intraperitoneal, nos intervalos de 1, 12, 24, 48 e 72 horas após a administração do etanol.

4.6 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os animais foram divididos em dois grupos: grupo Etanol (15 animais) e grupo controle (10 animais). Todos foram submetidos à gavagem no mesmo tempo e a peritonite foi induzida 1,12,24,48 e 72 horas após os procedimentos de gavagem. Seis horas após a indução da peritonite os animais eram eutanasiados, a cavidade peritoneal era lavada com PBS-EDTA para contagem das células do exsudato e das unidades formadoras de colônia das bactérias inoculadas.

Fluxograma experimental:



4.7 CONTAGEM GLOBAL E DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS NO LAVADO PERITONEAL

Seis horas após a indução da peritonite, os animais do grupo controle e do grupo alcoolizado foram sacrificados por anestesia geral injetável, induzida por barbitúrico (Tiopental).

A cavidade peritoneal de cada animal foi lavada com 3 mL de PBS+ EDTA 0.1M. Em seguida, o lavado peritoneal foi coletado e dividido em duas partes: uma parte destinada à contagem global e diferencial dos leucócitos e a outra parte foi utilizada para determinação da concentração bacteriana.

A contagem global das células foi feita em câmara de Neubauer após diluição em solução de Turk. A contagem diferencial dos leucócitos foi feita em esfregaços obtidos em citocentrífuga e corados com conjunto corante hematológico rápido (DIPQUICK).

4.8 DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS (UFC) NO LAVADO PERITONEAL.

À partir de uma alíquota do lavado peritoneal foram realizadas diluições em tampão fosfato de 10, 100, 1000, 10000 vezes. 20µL das diluições foram plaqueados em meio ágar Müeller-Hinton e as placas vedadas em embalagens plásticas hermeticamente fechadas e incubadas por 24h a 37 °C em estufa.

Após o período de incubação, as colônias foram quantificadas e o número de UFC/mL do lavado foi determinado conforme descrito anteriormente.

O resultado foi expresso em \log_{10} do número de UFC/mL do lavado.

4.9 AVALIAÇÃO DO PESO DO TIMO

Como qualquer tipo de estresse induz ativação do eixo hipotálamo-hipófise, com aumento da produção de corticóides endógenos, a avaliação da involução do timo após uma agressão aguda, é um bom indicador da elevação dos níveis de corticóides plasmáticos. Para verificar se a quantidade de etanol utilizada nos experimentos (7g/g) foi capaz de induzir elevação dos níveis de corticóides, como demonstrado por HAN e colaboradores (1993 e 1995), foi feita a avaliação do peso do timo entre 24 e 120 horas após a administração do etanol em camundongos suíços. Um grupo de 12 camundongos recebeu a intoxicação pelo etanol como descrito acima e um grupo controle (4 animais) recebeu gavagem com mesmo volume de água destilada. Os animais foram eutanasiados com dose letal de barbitúrico (tiopental), 24, 48, 96 e 120 horas após a intoxicação aguda (três para cada intervalo; o grupo controle foi eutanasiado com 24 horas). Todos os animais que receberam etanol apresentaram sinais de intoxicação etílica aguda, evidenciada pelo andar cambaleante e com freqüência, imobilidade, por entrarem em estado de coma superficial, do qual se recuperavam 30 a 40 minutos depois.

O timo era dissecado e pesado em balança analítica. Eram incluídos em parafina e os cortes corados pela hematoxilina e eosina.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram compilados em uma planilha do Excel. A construção das figuras e a análise estatística (ANOVA one way com teste de Bonferroni) foi feita com o uso do Graph Pade Prisma 5.0. As análises de regressão da contagem de células em função do tempo foram realizadas com *software* Statistica 8.0 ®. Os valores de $P < 0,05$ foram considerados significantes.

5. RESULTADOS

Todos os animais que receberam etanol apresentaram sinais de intoxicação etílica aguda, evidenciada pelo andar cambaleante e com frequência, imobilidade por entrarem em estado de coma superficial, do qual se recuperavam 30 a 40 minutos depois. Os três animais que receberam a inoculação do *S. aureus* na primeira hora já tinham se recuperado do coma. Não ocorreu nenhum óbito nos animais que receberam o etanol.

Os valores da contagem global de leucócitos para os grupos etanol e controle, em função do tempo após a administração do etanol, estão apresentados na Tabela 1 e na figura 1.

Tabela 1. Resultados da contagem global de leucócitos em diferentes tempos, após administração por gavagem de etanol (7mg/g) ou água.

Tempo (h)	Leucócitos/mm ³ (média ± erro padrão)	
	Etanol	Controle
1	4800,00 ± 300,00	7262,5 ± 153,09
12	4650,00 ± 534,63	7075,0 ± 102,06
24	3591,60 ± 628,55	7837,5 ± 1092,06
48	6433,30 ± 466,89	6650,0 ± 183,71
72	7158,30 ± 556,09	8500,0 ± 40,82

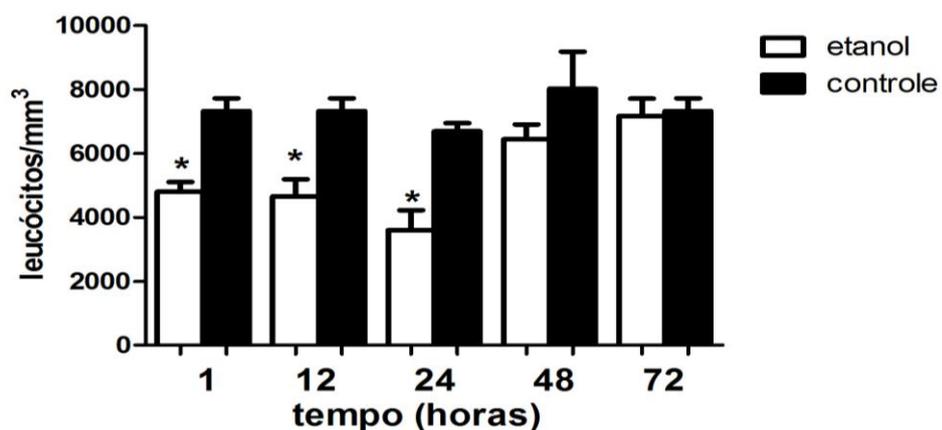


Figura 1. Contagem global de leucócitos na cavidade peritoneal após inoculação de *S. aureus*, em camundongos, em diferentes tempos após receberem por gavagem, 7mg/g de peso de etanol ou água. * Análise de variância (ANOVA one way) com teste de Bonferroni: $p < 0,05$.

A análise de regressão da contagem global de leucócitos para os grupos etanol e controle, em função do tempo está representada na Figura 2.

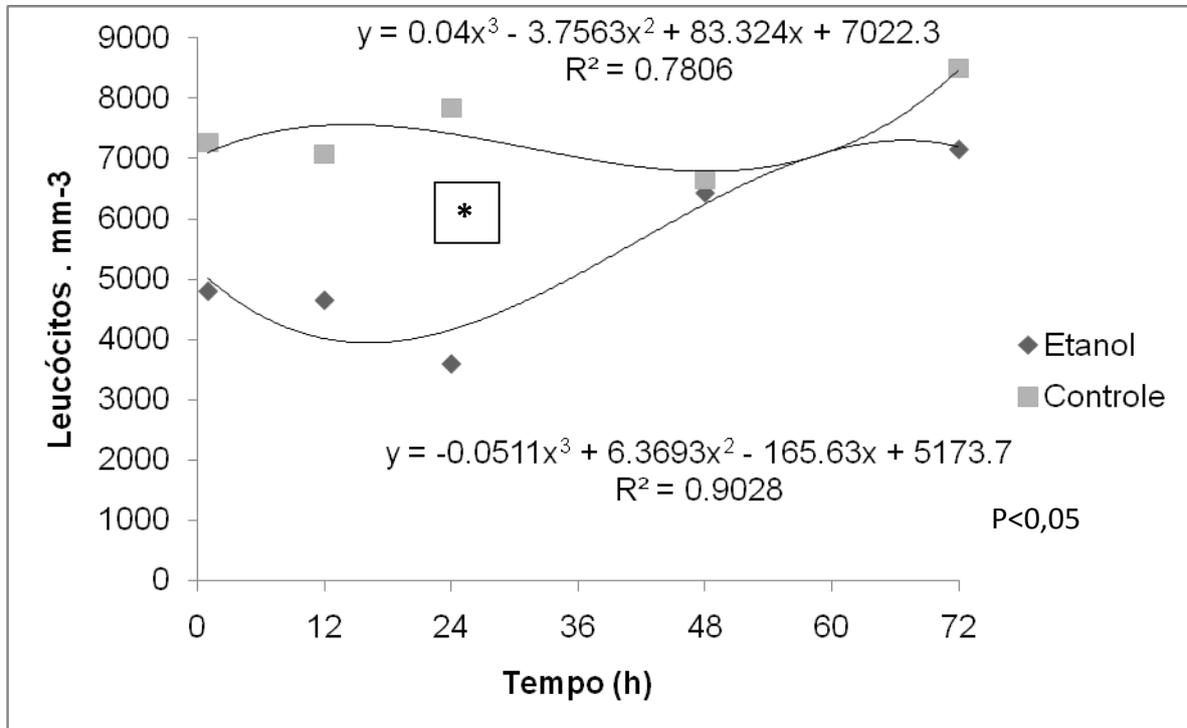


Figura 2. Análise de regressão em função do tempo da contagem de leucócitos na cavidade peritoneal de camundongos após receberem, por gavagem, etanol (7mg/g) ou água.

Como pode ser observado há redução significativa da exsudação de leucócitos até 48 horas após a administração do etanol. A curva de regressão em função do tempo confirma a significância dessa redução.

Os valores referentes às contagens de neutrófilos para os grupos etanol e controle, em função do tempo estão apresentados na Tabela 2 e na Figura 3.

Tabela 2. Resultados da contagem de neutrófilos em diferentes tempos após administração por gavagem de etanol (7mg/g) ou água.

Tempo (h)	Etanol (Neutrófilos . mm ⁻³)	Controle (Neutrófilos . mm ⁻³)
1	2384,00 ± 6,17	5918,94 ± 2,04
12	2185,50 ± 4,36	4704,88 ± 4,49
24	2023,31 ± 7,64	5329,50 ± 0,82
48	4567,67 ± 4,62	5253,50 ± 0,82
72	4772,22 ± 9,07	5992,50 ± 3,67

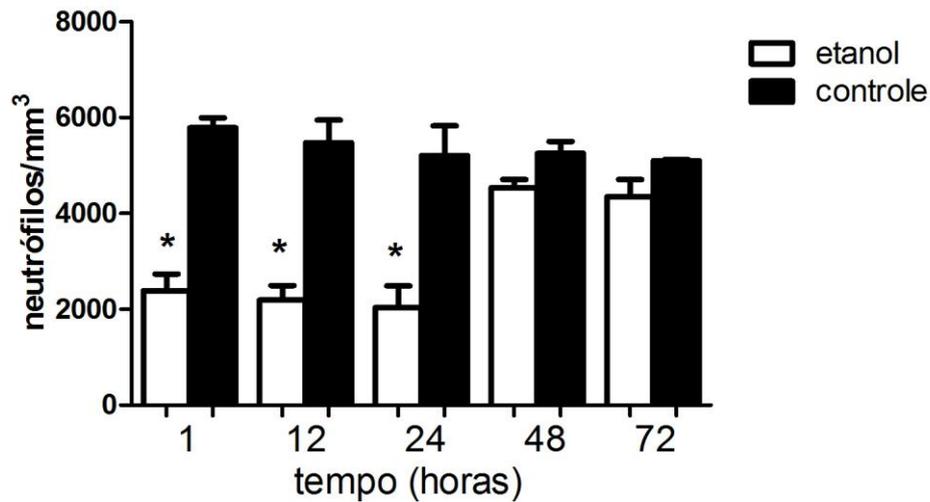


Figura 3 . Número de neutrófilos na cavidade peritoneal 6h após inoculação de *S. aureus* em camundongos, em diferentes tempos após receberem, por gavagem, 7mg/g de peso de etanol ou água. * Análise de variância com teste de Bonferroni: p<0,05)

A análise de regressão da contagem de neutrófilos em função do tempo para os grupos etanol e controle está representada na Figura 4.

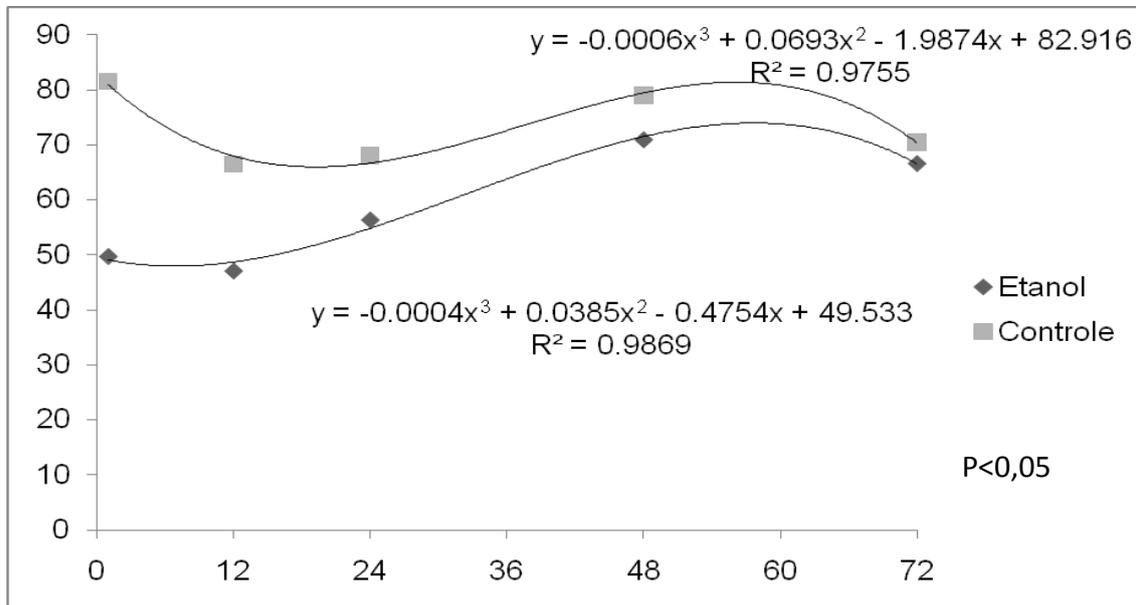


Figura 4. Análise de regressão em função do tempo da contagem de neutrófilos na cavidade peritoneal de camundongos após receberem, por gavagem, etanol (7mg/g) ou água.

Os valores da quantidade de mononucleares no exsudato da cavidade peritoneal, estão resumidos na figura 5.

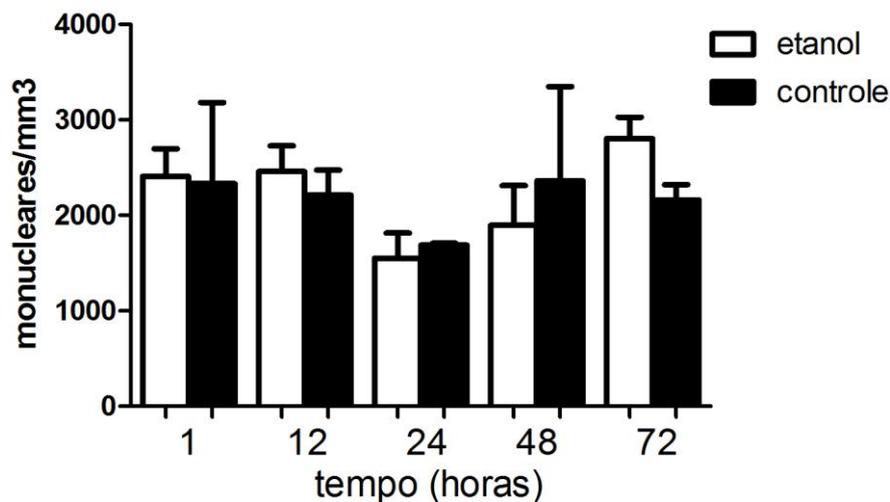


Figura 5. Número de mononucleares na cavidade peritoneal 6h após inoculação de *S. aureus* em camundongos, em diferentes tempos após receberem, por gavagem, 7mg/g de peso de etanol ou água. Análise de variância com teste de Bonferroni: $p > 0,05$.

Como pode ser observado a redução do número de leucócitos exsudados na cavidade peritoneal dos camundongos que receberam etanol, após a inoculação da suspensão de *S. aureus* foi devida a diminuição significativa do número de neutrófilos até 24 horas após a ingestão do etanol, já que a quantidade de mononucleares no exsudato não diferiu significativamente dos controles em nenhum dos tempos avaliados (A curva de regressão do número de neutrófilos em relação ao tempo confirma a significância da redução destes leucócitos).

O resultado da contagem de unidades formadoras de colônias no lavado peritoneal 6h após o inóculo da suspensão de *S. aureus*, em diferentes tempos após a administração por gavagem de etanol (7mg/g) ou água, está resumido na Tabela 3 e na Figura 6.

Tabela 3. Resultado da contagem de unidades formadoras de colônias de *S. aureus* no lavado peritoneal, 6h após a inoculação, após a administração, por gavagem, etanol (7mg/g) ou água. Os valores representam o Log_{10} do número de UFC. Os resultados representam a média e o EPM.

Tempo (h)	Etanol	Controle
1	7,11 ± 0,30	5,87 ± 0,22
12	6,32 ± 0,12	6,18 ± 0,67
24	6,18 ± 0,18	6,45 ± 0,09
48	5,47 ± 0,16	5,81 ± 0,00
72	6,56 ± 0,38	6,24 ± 0,30

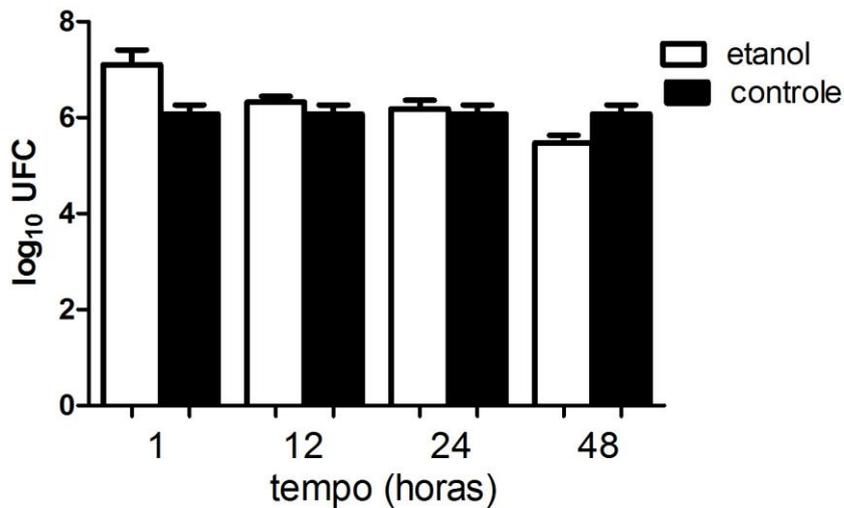


Figura 6. Resultado da contagem de unidades formadoras de colônias de *S. aureus* no lavado peritoneal, 6h após a inoculação, após a administração, por gavagem de etanol (7mg/g) ou água. Os valores representam o Log₁₀ do número de UFC. Os resultados representam a média e o EPM.

Como pode ser observado, embora tenha havido um aumento mais evidente na quantidade de UFC no grupo que recebeu o inóculo do *S aureus* uma hora após a ingestão do etanol, ela não foi significativa.

O resultado da avaliação do peso do timo está resumido na Figura 7. Como pode ser observado há uma redução significativa do peso do órgão 24 horas após a intoxicação aguda, a qual se recupera progressivamente até o quinto dia. O estudo histológico confirmou a involução, mostrando depleção acentuada dos linfócitos da cortical nas primeiras 24 horas, recuperada no quinto dias após a intoxicação etílica.

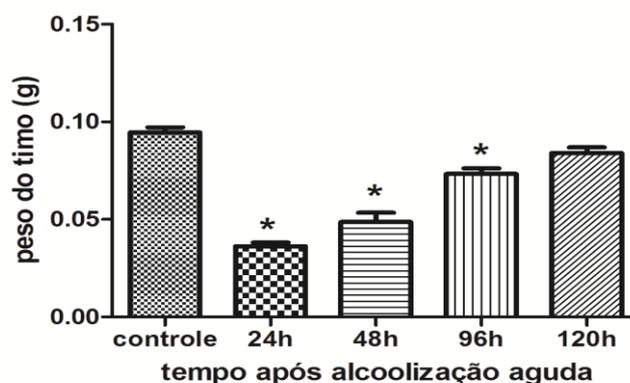


Figura 7. Peso do timo em camundongos suíços que receberam por gavagem, etanol na dose de 7mg/g de peso corporal.

7. DISCUSSÃO

A dose de etanol utilizada nos experimentos foi suficiente para induzir uma intoxicação aguda em todos os animais que apresentaram sinais evidentes de alterações no movimento e nos níveis de consciência, sem terem sido levados a um estado de coma profundo, irrecuperável.

A avaliação do peso do timo mostrou involução do órgão, sugerindo, que a intoxicação etílica aguda em camundongos aumenta a secreção de corticóides endógenos, o que em parte explica a lise de linfócitos na cortical do timo, conforme demonstraram Han e colaboradores (1993 e 1995). Esses autores demonstraram que a intoxicação etílica aguda aumentou os níveis de corticóides endógenos rapidamente nas primeiras duas horas, com queda rápida dos mesmos que retornaram aos níveis basais oito horas após a ingestão do etanol.

A utilização de um modelo experimental de peritonite, com avaliação do exsudato seis horas após a inoculação do *S aureus* se justifica, porque o objetivo principal foi avaliar a exsudação de neutrófilos e esta ocorre em grande intensidade entre três e 12 horas após a agressão. Por outro lado a liberação de corticóides endógenos relacionados com o estresse produzido pela contenção do animal e inoculação das bactérias (indução da inflamação) é curto, retornando a normalidade em até 8 horas (HAN et al., 1993)

Os resultados mostram que existe redução da exsudação de leucócitos na cavidade peritoneal dos camundongos alcoolizados após indução da peritonite estafilocócica até 24 horas após a ingestão do etanol. A contagem diferencial dos leucócitos exsudados mostrou que a redução do número global de leucócitos exsudados foi decorrente principalmente da redução dos neutrófilos, fato demonstrado pela manutenção de número semelhante de mononucleares no grupo etanol em relação ao grupo controle. Nas primeiras 12 horas, fica muito evidente a redução relativa e absoluta de neutrófilos, como demonstrado na curva de regressão. Essa redução de neutrófilos se mantém significativa até 24 horas. Esses resultados confirmam e ampliam, em parte, dados da literatura. De fato, redução na exsudação de neutrófilos tem sido demonstrada em modelos experimentais (PICRELL, 1938 apud

BOÉ et al. 2001) e em humanos (LOURIA, 1963 apud SHELLITO et al., 2001; BRAYTON et al., 1970). Nessas observações não houve avaliação temporal do efeito inibidor da intoxicação etílica, tendo sido admitido que o efeito era devido à ação direta do etanol sobre os neutrófilos devido aos níveis elevados da alcoolemia. Na observação de Brayton et al. (1970) a alcoolemia estava entre 160 e 180 mg de etanol no plasma, no momento da execução do experimento. Os estudos sobre os efeitos diretos do etanol na quimiotaxia de granulócitos apresentam resultados controversos. Enquanto alguns experimentos demonstraram diminuição da quimiotaxia de neutrófilos, *in vitro*, após pré-incubação dos leucócitos com baixas concentrações de álcool (KLEPSEK; NUNGESTER, 1939; PHELPS; STANISLAW, 1969), outros estudos observaram redução da resposta quimiotática apenas em concentrações superiores às observadas no plasma de pessoas com intoxicação etílica (CROWLEY; ABRAMSON, 1971; SPAGNUOLO; MACGREGOR, 1975; HALLENGREN; FORSGREN, 1978). No experimento aqui relatado não foi avaliada a alcoolemia, mas se sabe que entre 12 e 24 horas após a ingestão do etanol a alcoolemia é muito baixa ou inexistente (CARSON; PRUETT, 1996). Portanto a redução da migração de neutrófilos observada nos experimentos aqui relatados não devem ter sido decorrência de efeitos diretos do etanol

A única observação na qual se testou a duração do efeito da intoxicação etílica aguda em um modelo experimental de inflamação demonstrou que em camundongos a exsudação de leucócitos para uma bolsa de ar subcutânea após inoculação de carragenina estava reduzida até 7 horas após a intoxicação etílica aguda, mas não foi significativamente diferente se a inflamação foi induzida 20 h depois (SAEED et al., 2004). Os autores não mostraram dados sobre a contagem diferencial das células do exsudato, mas relatam que houve redução tanto de neutrófilos como de monócitos no exsudato. A discordância parcial desses resultados com os aqui apresentados, mostrando que a redução da exsudação de neutrófilos persiste por 24 horas, pode estar relacionada ao modelo utilizado. O desafio utilizado por Saeed et al. (2004) foi feito em uma bolsa de ar no subcutâneo do camundongo, um ambiente diferente da cavidade peritoneal. Nesta já existem macrófagos residentes em grande quantidade e a chegada do agente inflamatório (no caso os estafilococos) induz uma resposta rápida com ativação das células

residentes as quais produzem as quimiocinas necessárias para atrair os leucócitos. Na bolsa de ar o agente irritante induz a liberação de mediadores que atraem as primeiras células, entre as quais macrófagos responsáveis por produzir a grande migração de neutrófilos.

Os mecanismos envolvidos na redução, induzida pelo etanol, da exsudação de neutrófilos para uma área inflamada, não estão bem esclarecidos. Como citado na revisão da literatura, alguns autores que estudaram o fenômeno em humanos e em animais de laboratório (PICRELL, 1938 apud BOÉ et al., 2001; LOURIA, 1963 apud SHELLITO et al., 2001; BRAYTON et al., 1970) sugerem que o efeito direto do etanol seria o mecanismo mais importante, inclusive explicando a curta duração do efeito observado. No entanto a maioria dos autores admite que o uso do etanol, tanto agudo como crônico altera mecanismos da resposta imunitária inata e adquirida, como já apresentado na revisão de literatura desse texto. É possível, portanto, que alterações na resposta imunitária inata estejam envolvidas na redução da resposta inflamatória, especialmente na exsudação celular observada após intoxicação aguda com o etanol.

No modelo aqui utilizado a inflamação da cavidade peritoneal começa com PAMP do *S. aureus* ativando macrófagos residentes, responsáveis por produzir as quimiocinas CXC, que induzirão a exsudação dos neutrófilos para a cavidade peritoneal. Estes migram após rolamento e adesão ao endotélio, nos quais a selectina P exerce papel importante (MERCER-JONES et al., 1999). Portanto, a participação inicial de macrófagos é crucial na exsudação de neutrófilos para a cavidade peritoneal após a introdução de um agente inflamatório. De fato, de-Souza e Ferreira (1985) demonstraram que o tratamento de animais com soro anti-macrofágico inibe a exsudação de neutrófilos para a cavidade peritoneal. Uma das principais quimiocinas CXC liberadas pelos macrófagos peritoneais para atrair leucócitos é a CXCL2 (MIP-2, Macrophage Inflammatory Protein-2), que inoculada na cavidade peritoneal de camundongos induz migração de neutrófilos em um modelo de peritonite fecal (MARK et al., 1999). Esses autores demonstraram que a CXCL2 interage com mastócitos nesse processo, sem liberação de histamina.

Como descrito na revisão de literatura o etanol pode afetar a sinalização de TLRs (YAMASHINA et al., 2000; MANDREKAR; BELLEROSE; SZABO, 2002), reduzir

quimiocinas CXC e citocinas pró-inflamatórias (CHEN et al., 1993; VERMA et al., 1993; SZABO et al., 1995a, b; 1996; ZHANG et al., 2002) em macrófagos, comprometendo assim a produção dos principais fatores que agem na fase inicial da migração de leucócitos para uma área inflamada que é a ativação do endotélio (citocinas) e a produção de quimiocinas. Além do mais a intoxicação aguda pelo etanol altera, no endotélio, a expressão de moléculas de adesão dificultando a segunda fase da exsudação celular que é a captura, rolamento, aderência e transmigração de leucócitos. Desse modo, no modelo experimental aqui apresentado, a redução da migração de neutrófilos nas primeiras seis horas após a inoculação de *S aureus* estaria ligada ao efeito do etanol (ou seus metabólitos) sobre os macrófagos peritoneais e células endoteliais, reduzindo a produção de citocinas e quimiocinas e a expressão de moléculas de adesão. As observações aqui apresentadas mostram que esse retardo precoce na migração de neutrófilos pode persistir até 24 horas após o episódio de intoxicação etílica aguda.

Por outro lado, a redução na exsudação de neutrófilos não foi associada a uma significativa redução no número das bactérias inoculadas na cavidade peritoneal, avaliadas seis horas após o inoculo. Não temos uma explicação adequada para essa observação. É possível que o tempo de observação tenha sido muito curto para avaliar o impacto da redução dos neutrófilos na capacidade microbicida da cavidade peritoneal, que poderia ter sido pouco alterada já que o número de mononucleares no exsudato não diminuiu significativamente no período de observação. Pruet et al. (2010) demonstraram que há aumento da mortalidade de camundongos submetidos a alcoolização aguda e infectados com *Escherichia coli* até 21 horas após a alcoolização, admitindo que tenha havido facilitação da proliferação das bactérias inoculadas. Esses autores mostraram que desde duas horas após o inoculo das bactérias o número de macrófagos peritoneais com bactérias endocitadas foi significativamente maior no grupo alcoolizado, admitindo que o poder microbicida dessas células pudesse estar comprometido.

Pode ser levantada a hipótese de que o estresse induzido pela alcoolização aguda pudesse estar interferindo na exsudação de leucócitos. De fato, a intoxicação etílica aguda em camundongos ativa o eixo hipotálamo-hipófise e induz involução do timo, o que foi confirmado nos experimentos aqui relatados. No entanto uma observação experimental avaliando os níveis de glicocorticóides em camundongos submetidos a

uma intoxicação etílica aguda, mostrou, que embora elevados, não eram suficientes para alterar os níveis de citocinas pró-inflamatórias e as respostas de receptores da família TLR (GLOVER e PRUETT, 2006; GLOVER et al., 2009).

Em conclusão, os resultados aqui apresentados demonstram que um episódio de intoxicação etílica aguda diminui a exsudação de neutrófilos na cavidade peritoneal seis horas após a inoculação de *S aureus*, efeito esse persistente até 24 horas após a ingestão do etanol. A redução da exsudação de neutrófilos não foi seguida, no período observado, de uma aparente redução no poder microbicida da cavidade peritoneal.

8. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados mostraram que uma intoxicação etílica aguda em camundongos na dose de 7mg/g de peso corporal:

- (a) Reduziu significativamente a exsudação de neutrófilos para a cavidade peritoneal seis horas após a inoculação de uma suspensão de *S. aureus*. Esse efeito persistiu até 24 horas após ingestão do etanol.
- (b) Embora tenha reduzido a exsudação de neutrófilos, a redução da capacidade microbida da cavidade peritoneal frente aos estafilococos não foi significativa no período de observação.
- (c) Induziu involução do timo nas primeiras 24 horas, com recuperação da massa do timo no quinto dia após a intoxicação.

8. REFERÊNCIAS

- AKIRA, S.; SATO, S. Toll-like receptors and their signaling mechanisms. **Scand. J. Infect. Dis**, 35(9):555–562. 2003.
- ALDO-BENSON, M.; SCHEIDERERER, L.; DWULET, F. E. 2,4-Dinitrophenyl (DNP)-specific continuous B cell lines as a model system for studying B cell activation and tolerance. **Eur. J. Immunol**, 16(1):69-74. 1986.
- ALDO-BENSON, M. Mechanisms of alcohol-induced suppression of B-cell response. **Alcohol Clin. Exp. Res.**, 13(4):469-75. 1989.
- ALDO-BENSON, M.; KLUVE-BECKERMAN, B.; HARDWICK, J.; LOCKWOOD, M. Ethanol inhibits production of messenger ribonucleic acid for kappa-chain in stimulated B lymphocytes. **J. Lab. Clin. Med.**, 119(1):32-7. 1992a.
- ALDO-BENSON, M.; PRATT, L.; HARDWICK, J. Alcohol can inhibit effect of IL-4 on activated murine B cells. **Immunol. Res.**, 11(2):117-24. 1992b.
- ALOMAN, C.; GEHRING, S.; WINTERMEYER, P.; KUZUSHITA, N.; WANDS, J. R. Chronic ethanol consumption impairs cellular immune responses against HCV NS5 protein due to dendritic cell dysfunction. **Gastroenterology**, 132(2):698–708. 2007.
- ALONSO, M.; GOMEZ-RIAL, J.; GUDE, F.; VIDAL, C.; GONZALEZ-QUINTELA, A. Influence of experimental alcohol administration on serum immunoglobulin levels: contrasting effects on IgE and other immunoglobulin classes. **Int. J. Immunopathol. Pharmacol.**, 25(3):645-55. 2012.
- ANTONY, V. B.; GODBEY, S. W.; HOTT, J. W.; QUEENER, S. F. Alcohol-induced inhibition of alveolar macrophage oxidant release *in vivo* and *in vitro*. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, 17(2):389-93. 1993.
- APTE, M. V.; PHILLIPS, P. A.; FAHMY, R. G.; DARBY, S. J.; RODGERS, S. C.; MCCAUGHAN, G. W.; KORSTEN, M. A.; PIROLA, R. C.; NAIDOO, D.; WILSON, J. S. Does alcohol directly stimulate pancreatic fibrogenesis? Studies with rat pancreatic stellate cells. **Gastroenterology**, 118(4):780–794. 2000.
- ARBABI, S.; GARCIA, I.; BAUER, G. J.; MAIER, R. V. Alcohol (ethanol) inhibits IL-8 and TNF: role of the p38 pathway. **J. Immunol.**, 162(12):7441. 1999.
- BAGASRA, O.; HOWEEDY, A.; DORIO, R.; KAJDACSY-BALLA, A. Functional analysis of T-cell subsets in chronic experimental alcoholism. **Immunology**, 61(1):63-9. 1987.
- BALLAS, Z. K.; COOK, R. T.; SHEY, M. R.; COLEMAN, R. A. A dynamic flux in natural killer cell subsets as a function of the duration of alcohol ingestion. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, 36(5):826-34. 2012.
- BAUM, M. K.; RAFIE, C.; LAI, S.; SALES, S.; PAGE, J. B.; CAMPA, A. Alcohol use accelerates HIV disease progression. **AIDS Res. Hum. Retrov.** 26(5):511-518. 2010.

- BAUTISTA, A. P.; D'SOUZA, N. B.; LANG, C. H.; SPITZER, J. J. Modulation of f-met-leu-phe induced chemotactic activity and superoxide production by neutrophils during chronic ethanol intoxication. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, 16(4):788-94. 1992.
- BAUTISTA, A. P. Chronic alcohol intoxication enhances the expression of CD18 adhesion molecules on rat neutrophils and release of a chemotactic factor by Kupffer cells. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, 19(2):285-290. 1995.
- BAUTISTA, A. P. Chronic alcohol intoxication induces hepatic injury through enhanced macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2) production and intracellular adhesion molecule-1 expression in the liver. **Hepatology**, 25(2):335-342. 1997.
- BEN-ELIYAHU, S.; PAGE, G. G.; YIRMIYA, R.; TAYLOR, A. N. Acute alcohol intoxication suppresses natural killer cell activity and promotes tumor metastasis. **Nat. Med.**, 2(4):457-60. 1996.
- BIBER, K. L.; MOSCATELLO, K. M.; DEMPSEY, D. C.; CHERVENAK, R.; WOLCOTT, R. M. Effects of in utero alcohol exposure on B-cell development in the murine fetal liver. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, 22(8):1706-12. 1998.
- BLANK, S. E.; PFISTER, L. J.; GALLUCCI, R. M.; MEADOWS, G. G. Ethanol-induced changes in peripheral blood and splenic natural killer cells. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, 17(13):561-565. 1993.
- BLANK, S. E.; MEADOWS, G. G. Ethanol modulates metastatic potential of B16BL6 melanoma and host responses. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, 20(4): 624-628. 1996.
- BOÉ, D. M.; NELSON, S.; ZHANG, P.; BAGBY, G. J. Acute ethanol intoxication suppresses lung chemokine production following infection with *Streptococcus pneumoniae*. **J. Infect. Dis.**, 184(9):1134-42. 2001.
- BOUNDS, W.; BETZING, K. W.; STEWARD, R. M.; HOLCOMBE, R. F. Social drinking and the immune response: impairment of lymphokine-activated killer activity. **Am. J. Med. Sci.**, 307(6): 391-5. 1994.
- BOYADJIEVA, N.; DOKUR, M.; ADVIS, J. P.; MEADOWS, G. G.; SARKAR, D. K. Chronic ethanol inhibits NK cell cytolytic activity: role of opioid peptide beta-endorphin. **J. Immunol.**, 167(10):5645-52. 2001.
- BRASIL. Presidência da República. Secretaria Nacional de Políticas sobre Drogas. **Relatório brasileiro sobre drogas**. Brasília: SENAD, 2009. 364 p.
- BRAYTON, R. G.; STOKES, P. E.; SCHWARTZ, M.S.; LOURIA, D. B. Effect of alcohol and various diseases on leucocytes mobilization, phagocytosis and intracellular bacterial killing. **N. Engl. J. Med.**, 282(3):123-8. 1970.
- BREITMEIER, D.; BECKER, N.; WEILBACH, C.; ALBRECHT, K.; SCHEINICHEN, D.; PANNING, B.; SCHNEIDER, U.; JÜTTNER, B. Ethanol-induced malfunction of neutrophils respiratory burst on patients suffering From alcohol dependence. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, 32(10): 1708-1713. 2008.

BROWN, L. A.; HARRIS, F. L.; PING, X. D.; GAUTHIER, T. W. Chronic ethanol ingestion and the risk of acute lung injury: a role for glutathione availability? **Alcohol**, 33(3):191–197. 2004.

BROWN, L. A.; COOK, R.T.; JERRELLS, T.R.; KOLLS, J.K.; NAGY, L.E.; SZABO, G.; WANDS, J.R.; KOVACS, E.J. Acute and chronic alcohol abuse modulate immunity. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, 30(9):1624-1631. 2006.

BROWN, S. D.; BROWN, L. A. Ethanol (EtOH)-induced TGF- β 1 and reactive oxygen species production are necessary for EtOH-induced alveolar macrophage dysfunction and induction of alternative activation. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, 36(11):1952-62. 2012.

BJÖRKHOLM, M. Immunological and Hematological Abnormalities in Chronic Alcoholism. **Acta Med. Scand.**, 207(3):197-200. 1980.

BUCKLEY, R. M.; VENTURA, E. S.; MACGREGOR, R. R. Propranolol antagonizes the anti-inflammatory effect of alcohol and improves survival of infected intoxicated rabbits. **J. Clin. Invest.**, 62(3):554-9.. 1978.

CARDIER, J. E.; DEMPSEY, J. Thrombopoietin and its receptor, *c-mpl*, are constitutively expressed by mouse liver endothelial cells. **Blood**. 91(3):923–9. 1998.

CARSON EJ.; PRUETT, S.B Development and characterization of a binge drinking model in mice for evaluation of the immunological effects of ethanol. **Alcohol. Clin. Exp. Res.** 20(1):132-8. 1996.

CASTELLANO-HIGUERA, A.; GONZÁLEZ-REIMERS, E.; ALEMÁN-VALLS, M. R.; ABREU-GONZÁLEZ, P.; SANTOLARIA-FERNÁNDEZ, F.; DE LA VEGA-PRIETO, M. J.; GÓMEZ-SIRVENT, J. L.; PELAZAS-GONZÁLEZ, R. Cytokines and lipid peroxidation in alcoholics with chronic hepatitis C virus infection. **Alcohol Alcohol.**, 43(2):137-42. 2008.

CASTRO, A.; LEFKOWITZ, D. L.; LEFKOWITZ, S. S. The effects of alcohol on murine macrophage function. **Life Sci.**, 52(19):1585- 1593. 1993.

CEBRID - CENTRO BRASILEIRO DE INFORMAÇÕES SOBRE DROGAS PSICOTRÓPICAS – **Bebidas alcoólicas**. Departamento de Psicobiologia - UNIFESP/EPM, 2003.

CHANG, M. P.; NORMAN, D. C.; MAKINODAN, T. Immunotoxicity of alcohol in young and old mice. I. *In vitro* suppressive effects of ethanol on the activities of T and B immune cells of aging mice. **Alcohol. Clin. Exp. Res.** 14(2):210-5. 1990.

CHEN, G. J.; HUANG, D. S.; WATZL, B.; WATSON, R. R. Ethanol modulation of tumor necrosis factor and interferon production by murine splenocytes and macrophages. **Life Sci.** 52(15):1319-26. 1993.

CHEN, L. H.; HUANG, C. Y.; OSIO, Y.; FITZPATRICK, E. A.; COHEN, D. A. Effects of chronic alcohol feeding and murine AIDS virus infection on liver antioxidant defense systems in mice. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, 17(5):1022-8. 1993.

CONN, H. O. Bacterial translocation: studies of mice and men. **Am. J. Gastroenterol.** 93(2):277-8. 1998.

COOK, R. T.; LI, F.; VANDERSTEEN, D.; BALLAS, Z. K.; COOK, B. L.; LABRECQUE, D. R. Ethanol and natural killer cells. I. Activity and immunophenotype in alcoholic humans. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, 21(6):974–980. 1997.

COOK, R.T. Alcohol abuse, alcoholism and damage to the immune system. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, v. 22, p. 1927-1942, 1998.

CORREIA, J. P.; CONN, H. O. Spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis: endemic or epidemic? **Med. Clin. N. Am.** 59(4):963-81. 1975.

CROWLEY, J. P.; ABRAMSON, N. Effect of ethanol on complement-mediated chemotaxis. **Clin. Res.**, 19:415A. 1971.(Abstr.)

DAS, S. K.; VARADHAN, S.; GUPTA, G.; MUKHERJEE, S.; DHANYA, L.; RAO, D. N.; VASUDEVAN, D. M. Time-dependent effects of ethanol on blood oxidative stress parameters and cytokines. **Indian. J. Biochem. Biophys.** 46(1):116-21. 2009.

DAS, S. K.; MUKHERJEE, S.; VASUDEVAN, D. M. Effects of long-term ethanol consumption on adhesion molecules in liver. **Indian. J. Exp. Biol.**, 48: 394-401. 2010.

DE SOUZA G.E.; FERREIRA S.H. Blockade by antimacrophage serum of the migration of PMN neutrophils into the inflamed peritoneal cavity. **Agents Actions.** 17(1):97-103. 1985

D'SOUZA EL-GUINDY, N. B.; DE VILLIERS, W. J.; DOHERTY, D. E. Acute alcohol intake impairs lung inflammation by changing pro- and anti-inflammatory mediator balance.

DIAS, L.E.; MONTERO A.; GONZÁLEZ-GROSS, M.; VALLEJO, A.I.; ROMERO, J.; MARCOS, A. Influence of alcohol consumption on immunological status: a review. **Eur. J. Clin. Nutr.**, 56 (Suppl 3): S50-S53. 2002.

DOKUR, M.; BOYADJIEVA, N. I.; SARKAR, D. K. Reduction of perforin, granzyme B, and cytokine interferon gamma by ethanol in male Fischer 344 rats. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, 27(4):670-6. 2003.

DOLGANIUC, A.; KODYS, K.; KOPASZ, A.; MARSHALL, C.; MANDREKAR, P.; SZABO, G. 2003. Additive inhibition of dendritic cell allostimulatory capacity by alcohol and hepatitis C is not restored by DC maturation and involves abnormal IL-10 and IL-2 induction. **Alcohol. Clin. Exp. Res.** 27:1023–1031. 2003.

DREW, P. A.; CLIFTON, P. M.; LABOVOY, J. T.; SHEARMANN, D. J. Polyclonal B cell activation in alcoholic patients with no evidence of liver dysfunction. **Alcoholism**, 57(2):479-85. 1984.

EDSEN-MOORE, M. R.; FAN, J.; NESS, K. J.; MARIETTA, J. R.; COOK, R. T.; SCHLUETER, A. J. Effects of chronic ethanol feeding on murine dendritic cell

numbers, turnover rate, and dendropoiesis. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, 32(7):1309-20. 2008.

EWALD, S. J.; SHAO, H. Ethanol increases apoptotic cell death of thymocytes in vitro. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, 17(2):359-65. 1993.

FAINSILBER, Z.; FEINMAN, L.; SHAW, S.; LIEBER, C. S. Biphasic control of polymorphonuclear cell migration by Kupffer cells. Effect of exposure to metabolic products of ethanol. **Life Sci.**, 43(7):603-8. 1988.

FIXE, P.; PRALORAN, V. M-CSF: hematopoietic growth factor or inflammatory cytokine? **Cytokine**, 10(1):32-7. 1998.

GALANTE, D.; ANDREANA, A.; PERNA, P.; UTILI, R.; RUGGIERO, G. Decreased phagocytic and bactericidal activity of the hepatic reticuloendothelial system during chronic ethanol treatment and its restoration by levamisole. **J. Reticuloendothel Soc.**, 32(3):179-87. 1982.

GLASSMAN, A. B.; BENNETT, C. E.; RANDALL, C. L. Effects of ethyl alcohol on human peripheral lymphocytes. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, 109(6):540-2. 1985.

GLOVER M, PRUETT SB. Role of corticosterone in immunosuppressive effects of acute ethanol exposure on Toll-like receptor mediated cytokine production **J. Neuroimmune Pharmacol.** 1(4):435-42. 2006.

GLOVER M.; CHENG B.; FAN R.; PRUETT S. The role of stress mediators in modulation of cytokine production by ethanol. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 15;239(1):98-105. 2009.

GLUCKMAN, S. J.; MCGREGOR, R. R. E. Effect of acute alcohol intoxication on granulocyte mobilization and kinetics. **Blood**, 52:551-559. 1978.

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**, 75(3):553-9. 2004.

GRAMENZI, A.; CAPUTO, F.; BISELLI, M.; KURIA, F.; LOGGI, E.; ANDREONE P.; BERNARDI, M. Review article: alcoholic liver disease – pathophysiological aspects and risk factors. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, 24(8):1151-1161. 2006.

GREENBERG, S. S.; OUYANG, J.; ZHAO, X.; PARRISH, C.; NELSON, S.; GILES, T. D. Effects of ethanol on neutrophil recruitment and lung host defense in nitric oxide synthase I and nitric oxide synthase II knockout mice. **Alcohol. Clin. Exp. Res.** 23:1435. 1999.

GUARNERI, J. J.; LAURENZI, G. A. Effect of alcohol on the mobilization of alveolar macrophages. **J. Lab. Clin. Med.**, 72(1):40-51. 1968.

GURUNG, P.; YOUNG, B. M.; COLEMAN, R. A.; WIECHERT, S.; TURNER, LE.; RAY, N. B.; WALDSCHMIDT, T. J.; LEGGE, K. L.; COOK, R. T. Chronic ethanol induces inhibition of antigen-specific CD8+ but not CD4+ immunodominant T cell

responses following *Listeria monocytogenes* inoculation. **J. Leukoc. Biol.**, 85(1):34-43. 2009.

GUSTOT, T.; LEMMERS, A.; MORENO, C.; NAGY, N.; QUERTINMONT, E.; NICAISE, C.; FRANCHIMONT, D.; LOUIS, H.; DEVIERE, J.; LE MOINE, O. Differential liver sensitization to toll-like receptor pathways in mice with alcoholic fatty liver. **Hepatology**, 43(5):989–1000. 2006.

HAN, Y.C., LIN, T-L., PRUETT, S.B. Thymic atrophy caused by ethanol in a mouse model for binge drinking: involvement of endogenous glucocorticoides. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 123:16-25. 1993

HAN, Y.C., PRUETT, S.B. Mechanisms of ethanol-induced suppression of a primary antibody response in a mouse model for binge drinking. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 275(2):950-957. 1995

HAKULINEN, T.; LEHTIMÄK, L.; LEHTONEN, M.; TEPPONEN, L. Cancer morbidity among two male cohorts with increased alcohol consumption in Finland. **J. Natl. Cancer Inst.**, 52(6):1711-1714. 1974.

HALLENGREN, B.; FORSGREN, A. Effect of alcohol on Chemotaxis, Adherence and Phagocytosis of Human Polymorphonuclear Leucocytes. **Acta Med. Scand.**, 204(1-2):43-48. 1978.

HEINZ, R.; WALTENBAUGH, C. Ethanol consumption modifies dendritic cell antigen presentation in mice. **Alcohol. Clin. Exp. Res.** 31(10):1759-1771. 2007.

HERCEND, T.; SCHMIDT, R. E. Characteristics and uses of natural killer cells. **Immunol. Today**, 9(10):291–293. 1988.

HILL, D. B.; D'SOUZA, N. B.; LEE, E. Y.; BURIKHANOV, R.; DEACIUC, I. V.; DE VILLIERS, W. J. A role for interleukin-10 in alcohol-induced liver sensitization to bacterial lipopolysaccharide. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, 26(1):74-82. 2002.

HINES, I. N.; WHEELER, M. D. Recent advances in alcoholic liver disease III. Role of the innate immune response in alcoholic hepatitis. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, 287(2):G310–314. 2004.

HOEK, J. B.; PASTORINO, J. G. Ethanol, oxidative stress, and cytokine induced liver cell injury. **Alcohol**, 27(1):63–68. 2002.

IRWIN, M.; CALDWELL, C.; SMITH, T. L.; BROWN, S.; SCHUCKIT, M. A.; GILLIN, J. C. Major depressive disorder, alcoholism, and reduced natural killer cell cytotoxicity. **Arch. Gen. Psychiatry**, 47(8):713. 1990.

JAESCHKE, H.; GORES, G. J.; CEDERBAUM, A. I.; HINSON, J. A.; PESSAYRE, D.; LEMASTERS, J. J. Mechanisms of hepatotoxicity. **Toxicol. Sci.**, 65(2):166–176. 2002.

JÄRVELÄINEN, H. A.; FANG, C.; INGELMAN-SUNDBERG, M.; LINDROS, K. O. Effect of chronic coadministration of endotoxin and ethanol on rat liver pathology and proinflammatory and anti-inflammatory cytokines. **Hepatology**, 29(5):1503-10. 1999.

JERRELLS, T. R.; MARIETTA, C. A.; ECKARDT, M. J.; MAJCHROWICZ, E.; WEIGHT, F. F. Effect of Ethanol Administration on Parameters of Immunocompetency in Rats. **J. Leukoc. Biol.**, 39:499-510. 1986.

JERRELLS, T. R.; PERRITT, D.; ECKARDT, M. J.; MARIETTA, C. Alterations in interleukin-2 utilization by T-cells from rats treated with an ethanol-containing diet. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, 14(2):245-9. 1990a.

JERRELLS, T. R.; SMITH, W.; ECKARDT, M. J. Murine model of ethanol-induced immunosuppression. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, 14(4):546-50. 1990b.

JERRELLS, T. R.; SAAD, A. J.; KRUGER, T. E. Ethanol-induced suppression of in vivo host defense mechanisms to bacterial infection. In: FRIEDMAN, H.; KLEIN, T. W.; SPECTER, S. **Drugs of Abuse, Immunity and AIDS**, Plenum Press: New York. v. 335, pp.153-158. 1993.

JERRELLS, T. R.; SIBLEY, D. Effects of ethanol on T-cell-mediated immunity to infectious agents. In: FRIEDMAN, H.; KLEIN, T. W.; SPECTER, S. **Drugs of Abuse, Immunity and Infections**, CRC Press: Boca Ranton. pp.129-141. 1996.

JERRELLS, T. R.; VIDLAK, D.; STRACHOTA, J. M. Alcoholic pancreatitis: mechanisms of viral infections as cofactors in the development of acute and chronic pancreatitis and fibrosis. **J. Leukoc. Biol.**, 81(2):430-439. 2007.

JONSSON, A.S. M.; PALMBLAD, J. E. W. Effects of Ethanol on NF-kappaB Activation, Production of Myeloid Growth Factors, and Adhesive Events in Human Endothelial Cells. **J. Infect. Dis.**, 184(6):761-9. 2001.

JOSHI, P. C.; APPLEWHITE, L.; RITZENTHALER, J. D.; ROMAN, J.; FERNANDEZ, A. L.; EATON, D. C.; BROWN, L. A.; GUIDOT, D. M. Chronic ethanol ingestion in rats decreases granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor expression and downstream signaling in the alveolar macrophage. **J. Immunol.**, 175(10):6837-6845. 2005.

KAPASI, A. A.; PATEL, G.; GOENKA, A.; NAHAR, N.; MODI, N.; BHASKARAN, M.; REDDY, K.; FRANKI, N.; PATEL, J.; SINGHAL, P. C. Ethanol promotes T cell apoptosis through the mitochondrial pathway. **Immunology**, 108(3):313-20. 2003.

KAPLAN, D. R. A novel mechanism of immunosuppression mediated by ethanol. **Cell. Immunol.**, 102(1):1-9. 1986.

KAWAKAMI, M.; SWITZER, B. R.; HERZOG, S. R.; MEYER, A. A. Immune suppression after acute ethanol ingestion and thermal injury. **J. Surg. Res.**, 51(3): 210-215. 1991.

KHORUTS, A.; STAHNKE, L.; MCCLAIN, C. J.; LOGAN, G.; ALLEN, J. I. Circulating tumor necrosis factor, interleukin-1 and interleukin-6 concentrations in chronic alcoholic patients. **Hepatology**, 13(2):267-76. 1991.

KLEPSEK, R. G.; NUNGESTER, W. J. The effect of alcohol upon the chemotactic response of leukocytes. **J. Infect. Dis.**, 65(2):196-203. 1939.

- KOENIG, A.; YAKISAN, E.; REUTER, M.; HUANG, M.; SYKORA, K. W.; CORBACIOGLU, S.; WELTE, K. Differential regulation of stem cell factor mRNA expression in human endothelial cells by bacterial pathogens: an *in vitro* model of inflammation. **Blood**, 83(10):2836–43. 1994.
- 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.**, 268 (6 Pt 1):L991–L998. 1995.
- LAU, A. H.; ABE, M.; THOMSON, A. W. Ethanol affects the generation, cosignaling molecule expression, and function of plasmacytoid and myeloid dendritic cell subsets *in vitro* and *in vivo*. **J. Leukoc. Biol.**, 79(5):941-953. 2006.
- LAURENZI, G. A.; GUARNERI, J. J. A study of the mechanisms of pulmonary resistance to infection: The relationship of bacterial clearance to ciliary and alveolar macrophage function. **Am. Rev. Respir. Dis.**, 93(3):134-145. Mar. 1966.
- LASO, F. J.; VAQUERO, J. M.; ALMEIDA, J.; MARCOS, M.; OFRAO, 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.**, 31(5):846–854. 2007.
- LE MOINE, O.; MARCHANT, A.; DE GROOTE, D.; AZAR, C.; GOLDMAN, M.; DEVIERE, J. Role of defective monocyte interleukin-10 release in tumor necrosis factor-alpha overproduction in alcoholic cirrhosis. **Hepatology**, 22(5):1436–1439. 1995.
- LEDERER, S. L.; WALTERS, K. A.; PROLL, S.; PAEPER, B.; ROBINZON, S.; BOIX, L.; FAUSTO, N.; BRUIX, J.; KATZE, M. G. Distinct cellular responses differentiating alcohol- and hepatitis C virus- induced liver cirrhosis. **Virology**, 349:98. 2006.
- LENHOFF, S.; OLOFSSON, T. Cytokine regulation of GM-CSF and G-CSF secretion by human umbilical cord vein endothelial cells (HUVEC). **Cytokine**, 8(9):702–9. 1996.
- LI, F.; COOK, R. T.; ALBER, C.; RASMUSSEN, W.; STAPLETON, J. T.; BALLAS, Z. K. Ethanol and natural killer cells. II. Stimulation of human natural killer activity by ethanol *in vitro*. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, 21(6):981–987. 1997.
- LIBON, C.; FORESTIER, F.; COTTE-LAFFITTE, J.; LABARRE, C.; QUERO, A. M. Effect of acute oral administration of alcohol on superoxide anion production from mouse alveolar macrophages. **J. Leukoc. Biol.**, 53(1):93-8. 1993.
- LOURIA, D. B.; Susceptibility to infection during experimental alcohol intoxication. **Trans. Assoc. Am. Physicians**, 76:102. 1963.
- LUNDY, J.; WANEBO, H.; PINSKY, C.; STRONG, E.; OETTGEN, H. Delayed hypersensitivity reactions in patients with squamous cell cancer of the head and neck. **Am J. Surg.**, 128(4):530-3. 1974.

LUNDY, J.; RAAF, J. H.; DEAKINS, S.; WANEBO, H. J.; JACOBS, D. A.; LEE, T.; JACOBOWITZ, D.; SPEAR, C.; OETTGEN, H. F. The acute and chronic effects of alcohol on the human immune system. **Surg. Gynecol. Obstet.**, 141(2):212-8, 1975.

MACGREGOR, R. R.; SPAGNUOLO, P. J.; LENTNEK, A. L. Inhibition of granulocyte adherence by ethanol, prednisone, and aspirin, measured with a assay system. **N. Engl. J. Med.**, 291(13):642. 1974.

MACGREGOR, R. R. Alcohol and immune defense. **JAMA**, 256(11):1474–1479. 1986.

MALTBY, J.; WRIGHT, S.; BIRD, G.; SHERON, N. Chemokine levels in human liver homogenates: associations between GRO α and histopathological evidence of alcoholic hepatitis. **Hepatology**, 24(5):1156-60. 1996.

MANDREKAR, P.; CATALANO, D.; GIROUARD, L.; SZABO, G. Human monocyte IL-10 production is increased by acute ethanol treatment. **Cytokines**, 8(7):567–577. 1996.

MANDREKAR, P.; BELLEROSE, G.; SZABO, G. Inhibition of NF- κ B binding correlates with increased nuclear glucocorticoid receptor levels in acute alcohol treated human monocytes. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, 26(12):1872-9. 2002.

MANDREKAR, P., D. CATALANO, A. DOLGANIUC, K. KODYS, AND G. SZABO. Inhibition of myeloid dendritic cell accessory cell function and induction of T cell anergy by alcohol correlates with decreased IL-12 production. **J. Immunol.** 173:3398–3407. 2004.

MCCLAIN, C. J.; COHEN, D. A. Increased tumor necrosis factor production by monocytes in alcoholic hepatitis. **Hepatology**, 9(3):349-51. 1989.

MCCLAIN, C. J.; BARVE, S.; BARVE, S.; DEACIUC, I.; HILL, D. B. Tumor necrosis factor and alcoholic liver disease. **Alcohol. Clin. Exp. Res**, 22(5 Suppl):248S-252S. 1998.

MEADOWS, G. G.; ELSTAD, C. A.; BLANK, S. E.; GALLUCCI, R. M.; PFISTER, L. J. Alcohol consumption suppresses metastasis of B16-BL6 melanoma in mice. **Clin. Exp. Metastasis**, 11(2): 191–199. 1993.

MEDZHITOV, R.; PRESTON-HURLBURT, P.; JANEWAY, C. A. JR. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. **Nature**, 388:394-397. 1997.

MENDENHALL, C. L.; THEUS, S. A.; ROSELLE, G. A.; GROSSMAN, C. J.; ROUSTER, S. D. Biphasic in vivo immune function after low- versus highdose alcohol consumption. **Alcohol**, 14(3):255 – 260. 1997.

MERCER-JONES M.A.; SHROTRI M.S.; HEINZELMANN M.; PEYTON J.C.; CHEADLE W.G. Regulation of early peritoneal neutrophil migration by macrophage inflammatory protein-2 and mast cells in experimental peritonitis. **J. Leukoc. Biol.**, 65(2):249-55. 1999.

MILI, F.; FLANDERS, W.D.; BORING, J.R.; ANNEST J.L.; DE STEFANO, F. The associations of alcohol drinking and drinking cessation to measures of the immune system in middle-aged men. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, 16(4):688-694. 1992.

MOSCATELLO, K. M.; BIBER, K. L.; JENNINGS, S. R.; CHERVENAK, R.; WOLCOTT, R. M. Effects of in utero alcohol exposure on B cell development in neonatal spleen and bone marrow. **Cell. Immunol.**, 191(2):124-30. Feb. 1999.

NAIR, M.P.; KRONFOL Z.A.; SCHWARTZ S.A. Effects of alcohol and nicotine on cytotoxic functions of human lymphocytes. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, 54(3):395-409. 1990.

NESS, K. J.; FAN, J.; WILKE, W. W.; COLEMAN, R. A.; COOK, R. T.; SCHLUETER, A. J. Chronic ethanol consumption decreases murine Langerhans cell numbers and delays migration of Langerhans cells as well as dermal dendritic cells. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, 32(4): 657–668. 2008.

NELSON, S.; BAGBY, G. J.; BAINTEON, G.; WARREN, W. R. The effects of acute and chronic alcoholism on TNF α and inflammatory responses. **J. Infect. Dis.**, 160(3):422–429. 1989.

NELSON, S.; BAGBY, G.; ANDRESEN, J.; NAKAMURA, C.; SHELLITO, J.; SUMMER, W. The effects of ethanol, tumor necrosis factor, and granulocyte colony-stimulating factor on lung antibacterial defenses. **Adv. Exp. Med. Biol.**, 288:245–253. 1991.

NILSSON, E.; PALMBLAD, J. Effects of ethanol on mechanisms for secretory and aggregatory responses of human granulocytes. **Biochem. Pharmacol.**, 37(17):3237-43. 1988.

NILSSON, E.; THOMSEN, P.; ERICSON, L.; PALMBLAD, J. Rabbit polymorphonuclear granulocyte function during ethanol administration--migration and oxidative responses in a joint with immune complex synovitis. **Clin. Exp. Immunol.**, 102(1):137-43. 1995.

NISHIYAMA, D.; IKEJIMA, K.; HONDA, H.; HIROSE, M.; TAKEI, Y.; SATO, N. Acute ethanol administration downregulates toll-like receptor-4 in the murine liver. **Hepatol. Res.**, 23(2):130–137. 2002.

OAK, S.; MANDREKAR, P.; CATALANO, D.; KODYS, K.; SZABO, G. TLR2- and TLR4-mediated signals determine attenuation or augmentation of inflammation by acute alcohol in monocytes. **J. Immunol.**, 176(12):7628–7635. 2006.

OSTROVIDOV, S.; HOWARD, L. M.; IKEDA, M.; IKEDA, A.; WALTEBAUGH, C. Restoration of ethanol-compromised T(h)1 responses by sodium orthovanadate. **Int. Immunol.**, 14(11):1239-45. 2002.

PARLESAK, A.; DIEDRICH, J. P.; SCHÄFER, C.; BODE, C. A low concentration of ethanol reduces the chemiluminescence of human granulocytes and monocytes but not the tumor necrosis factor alpha production by monocytes after endotoxin stimulation. **Infect. Immun.**, 66(6):2809-13. 1998.

PERCIVAL, S. S.; SIMS, C. A. Wine modifies the effects of alcohol on immune cells of mice. **J. Nutr.**, 130(5):1091-4. 2000.

PEREIRA, F.E.L. Imunopatologia. In: FILHO, G.B. **Bogliolo Patologia**. 8.Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. p. 277.

PEREZ, H. D.; ROLL, F. J.; BISSELL, D. M.; SHAK, S.; GOLDSTEIN, I. M. Production of chemotactic activity for polymorphonuclear leukocytes by cultured rat hepatocytes exposed to ethanol. **J. Clin. Invest.**, 74:1350-1357. 1984.

PETERSON, J. D.; VASQUEZ, K.; WALTENBAUGH, C. Interleukin-12 therapy restores cell-mediated immunity in ethanol-consuming mice. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, 22(1):245-51. 1998.

PHELPS, P. STANISLAW, D. Polymorphonuclear leukocyte motility *in vitro*. I. Effect of pH, temperature, ethyl alcohol, and caffeine, using a modified Boyden chamber technic. **Arthritis Rheum.**, 12(3):181-8. 1969.

PICKRELL, K. L. The effect of alcoholic intoxication and ether anesthesia on resistance to pneumococcal infection. **Exp. Biol. Med.**, 38(2):265-267. 1938.

PRUETT, S. B.; HAN, Y. C.; WU, W. J. A brief review of immunomodulation caused by acute administration of ethanol: involvement of neuroendocrine pathways. **Alcohol Alcohol Suppl**, 2:431-7. 1994.

PRUETT, S. B.; FAN, R.; ZHENG, Q. Acute ethanol administration profoundly alters poly I:C-induced cytokine expression in mice by a mechanism that is not dependent on corticosterone. **Life Sci.**, 72(16):1825-39. 2003.

PRUETT, S.B.; SCHWAB, C.; ZHENG, Q.; FAN, R. Suppression of innate immunity by acute ethanol administration: a global perspective and a new mechanism beginning with inhibition of signaling through TLR3. **J. Immuno.**, 173(4): 2715-24. 2004.

PRUETT, S.B.; FAN, R.; ZHENG, Q.; SCHWAB, C. Differences in IL-10 and IL-12 production patterns and differences in the effects of acute ethanol treatment on macrophages *in vivo* and *in vitro*. **Alcohol**, 37(1): 1-8. 2005.

PRUETT, S.B.; FAN, R.; CHENG, B.; GLOVER, M.; TAN, W.; DENG, X. Innate immunity and inflammation in sepsis: mechanisms of suppressed host resistance in mice treated with ethanol in a binge-drinking model. **Toxicol. Sci.**, 117(2): 314-24. Oct. 2010.

REGEV, A.; JEFFERS, L. J. Hepatitis C and alcohol. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, 23(9):1543–1551. 1999.

REGINATO, W; MORAES-FILHO, J. P. Álcool e alcoolismo. **Ver. Bras. Clín. Ter.**, 15:79-82. 1986.

REIMOLD, A. M.; PONATH, P. D.; LI, Y. S.; HARDY, R. R.; DAVID, C. S.; STROMINGER, J. L.; GLIMCHER, L. H. Transcription factor B cell lineage-

specific activator protein regulates the gene for human X-box binding protein 1. **J. Exp. Med.**, 183(2):393-401. 1996.

ROLL, F. J.; ALEXANDER, M.; PEREZ, H. D. Generation of chemotactic activity for neutrophils by liver cells metabolizing ethanol. **Free Radic. Biol. Med.**, 7(5):549-555. 1989.

ROLL, F. J.; ALEXANDER, M. A.; CUA, D.; SWANSON, W.; PEREZ, H. D. Metabolism of ethanol by rat hepatocytes results in generation of a lipid chemotactic factor: studies using a cell-free system and role of oxygen-derived free radicals. **Arch. Biochem. Biophys.**, 287(2):218-24. 1991.

ROSELLE, G. A. Alcohol and the immune system. **Alcohol Health Res. W.**, 16:16-22. 1992.

SACANELLA, E.; ESTRUCH, R.; GAYÀ, A.; FERNÁNDEZ-SOLÀ, J.; ANTÚNEZ, E.; URBANO-MÁRQUEZ, A. Activated lymphocytes (CD25+ CD69+ cells) and decreased CD19+ cells in well-nourished chronic alcoholics without ethanol-related diseases. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, 22(4):897-901. 1998.

SACANELLA, E.; ESTRUCH, R. The effect of alcohol consumption on endothelial adhesion molecule expression. **Addict Biol.**, 8(4): 371-8. 2003.

SAAD, A. J.; JERRELLS, T. R. Flow cytometric and immunohistochemical evaluation of ethanol-induced changes in splenic and thymic lymphoid cell populations. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, 15(5):796-803. 1991.

SAEED, R. W.; VARMA, S.; PENG, T.; TRACEY, K. J.; SHERRY, B.; METZ, C. N. Ethanol blocks leukocyte recruitment and endothelial cell activation *in vivo* and *in vitro*. **J. Immuno.**, 173(10): 6376-6383. 2004.

SAMET, J. H.; CHENG, D. M.; LIBMAN, H.; NUNES, D. P.; ALPEREN, J. K.; SAITZ, R. Alcohol consumption and HIV disease progression. **J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.**, 46(2):194-199. 2007.

SCHOPF, R. E.; TROMPETER, M.; BORK, K.; MORSCHE, B.; Effects of ethanol and acetaldehyde on phagocytic functions. **Arch. Dermatol. Res.**, 277(2):131-7. 1985.

SHELLITO, J. E.; QUAN ZHENG, M.; YE, P.; RUAN, S.; SHEAN, M. K.; KOLLS, J. Effect of alcohol consumption on host release of interleukin-17 during pulmonary infection with *Klebsiella pneumoniae*. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, 25(6):872-81. 2001.

SHIRATORI, Y.; JIN'NAI, H.; TERAOKA, H.; MATANO, S.; MATSUMOTO, K.; KAMII, K.; TANAKA, M.; OKANO, K. Phagocytic properties of hepatic endothelial cells and splenic macrophages compensating for a decreased phagocytic function of Kupffer cells in the chronically ethanol-fed rats. **Exp. Cell. Biol.**, 57(6):300-309. 1989a.

SHIRATORI, Y.; TERAOKA, H.; MATANO, S.; MATSUMOTO, K.; KAMII, K.; TANAKA, M. Kupffer cell function in chronic ethanol-fed rats. **Liver**, 9(6):351-359. 1989b.

SIGGINS, R. W.; BAGBY, G. J.; MOLINA, P.; DUFOUR, J.; NELSON, S.; ZHANG, P. Alcohol exposure impairs myeloid dendritic cell function in Rhesus macaques. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, 33(9): 1524–1531. 2009.

SMITH, F. E.; PALMER, D. L. Alcoholism, infection and altered host defenses: a review of clinical and experimental observations. **J. Chronic. Dis.**, 29(1):34-5. 1976.

SMITH, W. I.; VAN THIEL, D. H.; WHITESIDE, T.; JANSOSON, B.; MCGOVERN, J.; PAET, T.; ROBIN B. S. Altered immunity in male patients with alcoholic liver disease: evidence for defective immune regulation. **Alcoholism**, 4(2):199. 1980.

SPAGNUOLO, P. J.; MACGREGOR, R. R. Acute ethanol effect on chemotaxis and other components of host defense. **J. Lab. Clin. Med.**, 86:24-35. 1975.

SPINOZZI, F.; BERTOTTO, A.; RONDONI, F.; GERLI, R.; SCALISE, F.; GRIGNANI, F. T-lymphocyte activation pathways in alcoholic liver disease. **Immunology**. 73(2):140-6. 1991.

SPITZER, J. J.; BAUTISTA, A. P. Alcohol, cytokines and immunodeficiency. In: FRIEDMAN, H.; KLEIN, T. W.; SPECTER, S. Drugs of abuse, Immunity, and AIDS. **Adv. Exp. Med. Biol.**, 335:159-64. 1993.

SPRINGER, T. A. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. **Annu. Rev. Physiol.**, 57:827-72. 1995.

STARKENBURG, S.; MUNROE, M. E.; WALTENBAUGH, C. Early alteration in leukocyte populations and Th1/Th2 function in ethanol consuming mice. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, 25(8):1221-30. 2001.

STOLTZ, D. A.; NELSON, S.; KOLLS, J. K.; ZHANG, P.; BOHM, R. P. JR.; MURPHY-CORB, M.; BAGBY, G. J. *In vitro* ethanol suppresses alveolar macrophage TNF- α during simian immunodeficiency virus infection. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, 161(1):135–140. 2000.

SZABO, G.; VERMA, B. K.; FOGARASI, M.; CATALANO, D. E. Induction of transforming growth factor- β and prostaglandin E₂ production by ethanol in human monocytes. **J. Leukoc. Biol.**, 52(6):602-10. 1992.

SZABO, G.; VERMA, B.; CATALANO, D. Selective inhibition of antigen-specific T lymphocyte proliferation by acute ethanol exposure: the role of impaired monocyte antigen presentation capacity and mediator production. **J. Leukoc. Biol.**, 54(6):534-44. 1993.

SZABO, G.; MANDREKAR, P.; VERMA, B.; CATALANO, D. Acute ethanol uptake prior to injury modulates monocyte TNF- α production and mononuclear cell apoptosis. In: FAIST, E. **Immune Consequences of Trauma and Sepsis**. Springer-Verlag: Berlin. pp.252-260. 1995a.

SZABO, G.; MANDREKAR, P.A.; CATALANO, D. Inhibition of superantigen-induced T cell proliferation and monocyte IL-1 β , TNF- α and IL-6 production by acute ethanol treatment. **J. Leukoc. Biol.**, 58(3):342-345. 1995b.

- SZABO, G.; MANDREKAR, P.; NEWMAN, L.; CATALANO, D. Regulation of human monocyte functions by acute ethanol treatment: decreased TNF- α , IL-1 β and elevated IL-10, and TGF- β production. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, 20(5):900–907. 1996.
- SZABO, G. Consequences of alcohol consumption on host defence. **Alcohol Alcohol.**, 34(6):830-841. 1999.
- SZABO, G.; CATALANO, D.; WHITE, B.; MANDREKAR, P. Acute alcohol consumption inhibits accessory cell function of monocytes and dendritic cells. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, 28(5):824–828. 2004a.
- SZABO, G.; DOLGANIUC, A.; MANDREKAR, P.; WHITE, B. Inhibition of antigen-presenting cell functions by alcohol: implications for hepatitis C virus infection. **Alcohol**, 33(3):241–249. 2004b.
- SZABO, G.; MANDREKAR, P. A. A recent perspective on alcohol, immunity, and host defense. **Alcohol Clin. Exp. Res.**, 33(2):220-232. 2009.
- TAÏEB, J.; DELARCHE, C.; ETHUIN, F.; SELLOUM, S.; POYNARD, T.; GOUGEROT-POCIDALO, M. A.; CHOLLET-MARTIN, S. Ethanol-induced inhibition of cytokine release and protein degranulation in human neutrophils. **J. Leukoc. Biol.**, 72(6):1142-7. 2002.
- TAKEDA, K.; KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors. **Annu. Rev. Immunol.**, 21:335–376. 2003.
- TAMURA, D. Y.; MOORE, E. E.; PARTRICK, D. A.; JOHNSON, J. L.; OFFNER, P. J.; HARBECK, R. J.; SILLIMAN, C. C. Clinically relevant concentrations of ethanol attenuate primed neutrophil bactericidal activity. **J. Trauma**, 44(2):320. 1998.
- VALLES, S. L.; BLANCO, A. M.; AZORIN, I.; GUASCH, R.; PASCUAL, M.; GOMEZ-LECHON, M. J.; RENAUI-PIQUERAS, J.; GUERRI, C. Chronic ethanol consumption enhances interleukin-1-mediated signal transduction in rat liver and in cultured hepatocytes. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, 27(12):1979-86. 2003.
- VERMA, B. K.; FOGARASI, M.; SZABO, G. Down-regulation of tumor necrosis factor alpha activity by acute ethanol treatment in human peripheral blood monocytes. **J. Clin. Immunol.**, 13(1):8-22. 1993.
- WANG, Y.; HUANG, D. S.; GIGER, P. T.; WATSON, R. R. Ethanol-induced modulation of cytokine production by splenocytes during murine retrovirus infection causing murine AIDS. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, 17(5):1035-9. 1993.
- WATSON, R. R.; PRABHALA, R. H.; ABRIL, E.; SMITH, T. L. Changes in lymphocyte subsets and macrophage functions from high, short-term dietary ethanol in C57/BL6 mice. **Life Sci.** 43(10):865-70. 1988.
- WOLCOTT, R. M.; JENNINGS, S. R.; CHERVENAK, R. In utero exposure to ethanol affects postnatal development of T- and B- lymphocytes, but not natural killer cells. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, 19(1):170–6. 1995.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Status Report on Alcohol 2004**. Department of Mental Health and Substance Abuse. Geneva: WHO, 2004.

WU, W. J.; PRUETT, S. B. Ethanol decreases the number and activity of splenic natural killer cells in a mouse model for binge drinking. **J. Pharmacol. Exp. Ther**, 271(2):722-9. 1994.

WU, W. J.; PRUETT, S. B. Suppression of splenic natural killer cell activity in a mouse model for binge drinking: role of the neuroendocrine system. **J. Pharmacol. Exp. Ther**, 278(3):1331-9. 1996.

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.**, 277(3):686-90. 2000.

YIRMIYA, R.; BEN-ELIYAHU, S.; GALE, R. P.; SHAVIT, Y.; LIEBESKIND, J. C.; TAYLOR, A. N. Ethanol increases tumor progression in rats: Possible involvement of natural killer cells. **Brain. Behav. Immunol.**, 6(1):74-86. 1992.

ZHANG, P.; NELSON, S.; SUMMER, W. R.; SPITZER, J. A. Acute ethanol intoxication suppresses the pulmonary inflammatory response in rats challenged with intrapulmonary endotoxin. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, 21(5):773-8. 1997.

ZHANG, P.; BAGBY, G. J.; BOE, D. M.; ZHONG, Q.; SCHWARZENBERGER, P.; KOLLS, J. K.; SUMMER, W. R.; NELSON, S. Acute alcohol intoxication suppresses the CXC chemokine response during endotoxemia. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, 26(1):65-73. 2002.

ZUO, G.; GONG, J.; LIU, C.; WU, C.; LI, S.; DAI, L. Synthesis of Toll-like receptor 4 in Kupffer cells and its role in alcohol-induced liver disease. **Chin. Med. J. (Engl.)**, 116(2):297-300. 2003.