

GISLEINE DE FÁTIMA ZANONI CARVALHO



**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA CELULAR EM MACRÓFAGOS  
PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS APÓS INCUBAÇÃO  
COM ETANOL EM CONDIÇÕES DE CULTURA CELULAR:  
RELAÇÃO COM MICRONUTRIENTES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Departamento de Biologia Celular, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular.

Orientadora:  
Prof.<sup>ª</sup> Dr.<sup>ª</sup> Ana Lúcia Nicastri

CURITIBA  
2002

GISLEINE DE FÁTIMA ZANONI CARVALHO

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA CELULAR EM MACRÓFAGOS  
PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS APÓS INCUBAÇÃO  
COM ETANOL EM CONDIÇÕES DE CULTURA CELULAR:  
RELAÇÃO COM MICRONUTRIENTES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Departamento de Biologia Celular, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular.

Orientadora:  
Prof.<sup>ª</sup> Dr.<sup>ª</sup> Ana Lúcia Nicastri

CURITIBA  
2002

**Carvalho, Gisleine de Fátima Zanoni**

**Avaliação da resposta celular em macrófagos peritoneais de camundongos após incubação com etanol em condições de cultura celular: relação com micronutrientes / Gisleine de Fátima Zanoni Carvalho; Universidade Federal doParaná. – 2002.**

xii, 128 f.

**Orientador: Ana Lúcia Nicastri**

**Dissertação (mestrado) – Biologia Celular / Programa de Pós-graduação em Biologia Celular da Universidade Federal do Paraná.**

**1. Biologia celular. 2. Macrófagos. 3. Micronutrientes. 4. Células. I. Nicastri, Ana Lúcia. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.**

**CDD 574.87**

# PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

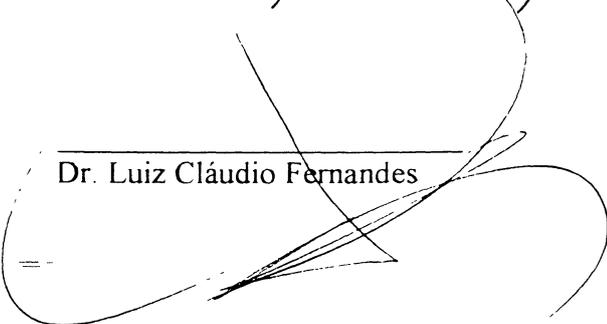
Departamento de Biologia Celular  
Setor de Ciências Biológicas  
Universidade Federal do Paraná

## PARECER

A Comissão Examinadora de Dissertação de Mestrado "AVALIAÇÃO DA RESPOSTA CELULAR EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS APÓS INCUBAÇÃO COM ETANOL EM CONDIÇÕES DE CULTURA CELULAR: RELAÇÃO COM MICRONUTRIENTES", de autoria da pós-graduanda Gisleine de Fátima Zaroni Carvalho, e constituída pelos Professores: Dr<sup>a</sup> Ana Lúcia Nicastrí (Orientadora e Presidente do Departamento de Biologia Celular da UFPR), Dra. Cláudia Maria da Penha Oller do Nascimento (UNIFESP) e Dr. Luiz Cláudio Fernandes (Departamento de Fisiologia - UFPR). Atribui individualmente as seguintes notas: Dr<sup>a</sup> Ana Lúcia Nicastrí, nota: dez ( 10,00 ), Dra. Cláudia Maria da Penha Oller do Nascimento, nota: dez ( 10,00 ) e Dr. Luiz Cláudio Fernandes, nota: dez ( 10,00 ) De acordo com as exigências do Regulamento do Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, a candidata foi: aprovada com a nota: dez ( 10,00 ), para a devida publicação o trabalho deve sofrer as modificações sugeridas. Em Curitiba, 25 de Abril de 2002.

  
Dr<sup>a</sup> Ana Lúcia Nicastrí

  
Dr<sup>a</sup> Cláudia Maria da Penha Oller do Nascimento

  
Dr. Luiz Cláudio Fernandes

Dedico a conclusão deste projeto, que se concretizou através desta dissertação, aos meus filhos: Eduardo e Guilherme, ao meu marido Alexandre, e aos meus pais Conceição e Giocondo. Agradeço pela compreensão em relação aos momentos de ausência, pelo apoio e paciência; e pelo sentimento que move a vida, o amor.

E dedico à minha amiga Márcia Helena Appel, pelo apoio científico e pessoal, e pelo seu grande poder de doação.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar à minha Orientadora Professora Doutora Ana Lúcia Nicastri, que através do seu Projeto de Pesquisa possibilitou minha entrada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular, permitindo o desenvolvimento de um Projeto Conjunto-Biologia Celular e Molecular e Nutrição.

Agradeço à CAPES pelo incentivo científico e financeiro, viabilizando este Projeto.

Agradeço ao Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular, Professor Doutor Ciro A. Oliveira Ribeiro por permitir que desse continuidade ao Projeto junto ao Laboratório de Pós-Graduação e Cultivo Celular do Departamento de Biologia Celular do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná; quando o TECPAR, representado pela co-orientadora, Doutora Elisa Gomes, desistiu do Projeto sem justificativas.

Agradeço em especial ao Professor Doutor Luiz Cláudio Fernandes, Professor Doutor Silvio Sanches Veiga e Professora Doutora Dorly de Freitas Buchi pela colaboração científica, pelos esclarecimentos, pelas idéias, sugestões e ainda pela permissão de uso de seus laboratórios, sem os quais seria impossível terminar a pesquisa.

Agradeço pelo apoio e paciência do Professor Herculano Salviano dos Reis Filho (Nino) e aos outros professores do Departamento que em maior ou menor grau sempre estiveram dispostos a auxiliar.

Agradeço aos alunos do Laboratório do Professor Doutor Silvio Sanches Veiga: Rafael, Juliana, Olga, Ana, José e em especial à minha amiga de mestrado Marcia Helena Appel, como também, à Professora Célia Regina Franco. Obrigada por tudo, e por facilitarem os horários no Laboratório de Cultivo Celular.

Agradeço aos amigos de Curso: Claudia Ota, Lyris de Godoy, Darcy Sato, Luiz Fernando Bianchini, Gabriel Carneiro de Leão, João César Zielack e Rosália Rubel.

Agradeço ao pessoal do Biotério, pela boa vontade; à Marlene Bonifácio de Camargo, pela paciência; à Telma S. de Assis e à Isabela Fernandes, da Biblioteca do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, pelas inúmeras buscas e pela boa vontade.

E finalmente, agradeço à bibliotecária Liliana Pizzolato pela grande ajuda e pela serenidade nesta etapa final da dissertação.

Quero agradecer a todas as pessoas que de alguma forma colaboraram para a conclusão deste Projeto.

E a DEUS por me manter saudável durante este processo.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS .....	viii
LISTA DE GRÁFICOS .....	x
LISTA DE SIGLAS .....	xii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>4</b>
2.1 MACRÓFAGOS.....	4
2.2 CULTURA CELULAR.....	10
2.3 ATUAÇÃO DO ETANOL NO ORGANISMO HUMANO .....	11
2.4 VITAMINAS E MINERAIS .....	16
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>28</b>
3.1 ANIMAIS .....	28
3.2 MATERIAL.....	28
3.3 OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS PERITONIAIS RESIDENTES.....	29
3.4 PROTOCOLO PARA HIGIENIZAÇÃO DE LAMÍNULAS DE VIDROS PARA POSTERIOR PLAQUEAMENTO.....	29
3.5 PLAQUEAMENTO PELO MÉTODO DA GOTA CENTRALIZADA.....	30
3.6 EFEITO DO ETANOL EM MACRÓFAGOS RESIDENTES PLAQUEADOS .....	31
3.7 EFEITO DO ETANOL SOBRE A FAGOCITOSE DE LEVEDURA <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> POR MACRÓFAGOS RESIDENTES PLAQUEADOS.....	31
3.8 MICROSCOPIA ÓPTICA .....	32
3.9 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO FAGOCÍTICA EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS.....	33
3.10 PADRONIZAÇÃO DE VITAMINAS E MICROELEMENTO ZINCO.....	33
3.11 EFEITO DA VITAMINA C EM MACRÓFAGOS PLAQUEADOS .....	34
3.12 EFEITO DO ETANOL E VITAMINA C EM MACRÓFAGOS PLAQUEADOS .....	34
3.13 EFEITO DA VITAMINA A EM MACRÓFAGOS PLAQUEADOS .....	35
3.14 EFEITO DO ETANOL E VITAMINA A EM MACRÓFAGOS PLAQUEADOS.....	35
3.15 EFEITO DA VITAMINA D <sub>3</sub> EM MACRÓFAGOS PLAQUEADOS .....	36
3.16 EFEITO DO ETANOL E VITAMINA D <sub>3</sub> EM MACRÓFAGOS PLAQUEADOS.....	36
3.17 EFEITO DA VITAMINA B <sub>12</sub> EM MACRÓFAGOS PLAQUEADOS .....	37

3.18 EFEITO DO ETANOL E VITAMINA B <sub>12</sub> EM MACRÓFAGOS PLAQUEADOS.....	37
3.19 EFEITO DO MICROELEMENTO ZINCO EM MACRÓFAGOS PLAQUEADOS .....	37
3.20 EFEITO DO ETANOL E ZINCO EM MACRÓFAGOS PLAQUEADOS .....	38
3.21 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>39</b>
<b>5 DISCUSSÕES</b> .....	<b>84</b>
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>102</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>105</b>
<b>APÊNDICES</b> .....	<b>110</b>

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - ANÁLISE DO PERCENTUAL DE MACRÓFAGOS QUE FAGOCITARAM LEVEDURA <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> QUANDO EXPOSTOS AO ETANOL EM CULTURA CELULAR POR 24 HORAS.....	39
TABELA 2 - ANÁLISE DO ÍNDICE FAGOCÍTICO EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS EXPOSTOS AO ETANOL EM CULTURA CELULAR POR 24 HORAS.....	40
TABELA 3 - ANÁLISE DO PERCENTUAL DE MACRÓFAGOS QUE FAGOCITARAM LEVEDURA <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> QUANDO EXPOSTOS À ÁGUA (CONTROLE) EM CULTURA CELULAR POR 24 HORAS .....	42
TABELA 4- ANÁLISE DO ÍNDICE FAGOCÍTICO EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS EXPOSTOS À ÁGUA EM CULTURA CELULAR POR 24 HORAS .....	43
TABELA 5 - ANÁLISE COMPARATIVA DO PERCENTUAL DE MACRÓFAGOS QUE FAGOCITARAM LEVEDURA <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> QUANDO EXPOSTOS AO ETANOL OU À ÁGUA EM CULTURA CELULAR POR 24 HORAS.....	45
TABELA 6 - ANÁLISE COMPARATIVA DO ÍNDICE FAGOCÍTICO EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS EXPOSTOS AO ETANOL OU À ÁGUA EM CULTURA CELULAR POR 24 HORAS .....	46
TABELA 7 - ANÁLISE DO PERCENTUAL DE MACRÓFAGOS QUE FAGOCITARAM LEVEDURA <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> QUANDO EXPOSTOS À VITAMINA C EM CULTURA CELULAR POR 24 HORAS .....	48
TABELA 8 - ANÁLISE DO ÍNDICE FAGOCÍTICO EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS EXPOSTOS À VITAMINA C EM CULTURA CELULAR POR 24 HORAS .....	49
TABELA 9 - ANÁLISE DO PERCENTUAL DE MACRÓFAGOS QUE FAGOCITARAM LEVEDURA <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> QUANDO EXPOSTOS AO ETANOL E À VITAMINA C EM CULTURA CELULAR POR 24 HORAS .....	51
TABELA 10 - ANÁLISE DO ÍNDICE FAGOCÍTICO EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS EXPOSTOS AO ETANOL E À VITAMINA C EM CULTURA CELULAR POR 24 HORAS.....	53
TABELA 11 - ANÁLISE DO PERCENTUAL DE MACRÓFAGOS QUE FAGOCITARAM LEVEDURA <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> QUANDO EXPOSTOS À VITAMINA A EM CULTURA CELULAR POR 24 HORAS.....	55
TABELA 12 - ANÁLISE DO ÍNDICE FAGOCÍTICO EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS EXPOSTOS À VITAMINA A EM CULTURA CELULAR POR 24 HORAS .....	56
TABELA 13 - ANÁLISE DO PERCENTUAL DE MACRÓFAGOS QUE FAGOCITARAM LEVEDURA <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> QUANDO EXPOSTOS AO ETANOL E À VITAMINA A EM CULTURA CELULAR POR 24 HORAS .....	58

TABELA 14 - ANÁLISE DO ÍNDICE FAGOCÍTICO EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS EXPOSTOS AO ETANOL E À VITAMINA A EM CULTURA CELULAR POR 24 HORAS .....	60
TABELA 15 - ANÁLISE DO PERCENTUAL DE MACRÓFAGOS QUE FAGOCITARAM LEVEDURA <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> QUANDO EXPOSTOS À VITAMINA D <sub>3</sub> EM CULTURA CELULAR POR 24 HORAS .....	62
TABELA 16 - ANÁLISE DO ÍNDICE FAGOCÍTICO EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS EXPOSTOS À VITAMINA D <sub>3</sub> EM CULTURA CELULAR POR 24 HORAS .....	63
TABELA 17 - ANÁLISE DO PERCENTUAL DE MACRÓFAGOS QUE FAGOCITARAM LEVEDURA <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> QUANDO EXPOSTOS AO ETANOL E À VITAMINA D <sub>3</sub> EM CULTURA CELULAR POR 24 HORAS .....	65
TABELA 18 - ANÁLISE DO ÍNDICE FAGOCÍTICO EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS EXPOSTOS AO ETANOL E À VITAMINA D <sub>3</sub> EM CULTURA CELULAR POR 24 HORAS .....	67
TABELA 19 - ANÁLISE DO PERCENTUAL DE MACRÓFAGOS QUE FAGOCITARAM LEVEDURA <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> QUANDO EXPOSTOS À VITAMINA B <sub>12</sub> EM CULTURA CELULAR POR 24 HORAS.....	69
TABELA 20 - ANÁLISE DO ÍNDICE FAGOCÍTICO EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS EXPOSTOS À VITAMINA B <sub>12</sub> EM CULTURA CELULAR POR 24 HORAS .....	70
TABELA 21 - ANÁLISE DO PERCENTUAL DE MACRÓFAGOS QUE FAGOCITARAM LEVEDURA <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> QUANDO EXPOSTOS AO ETANOL E À VITAMINA B <sub>12</sub> EM CULTURA CELULAR POR 24 HORAS .....	72
TABELA 22 - ANÁLISE DO ÍNDICE FAGOCÍTICO EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS EXPOSTOS AO ETANOL E À VITAMINA B <sub>12</sub> EM CULTURA CELULAR POR 24 HORAS .....	74
TABELA 23 - ANÁLISE DO PERCENTUAL DE MACRÓFAGOS QUE FAGOCITARAM LEVEDURA <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> QUANDO EXPOSTOS AO ZINCO EM CULTURA CELULAR POR 24 HORAS .....	76
TABELA 24 - ANÁLISE DO ÍNDICE FAGOCÍTICO EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS EXPOSTOS AO ZINCO EM CULTURA CELULAR POR 24 HORAS .....	78
TABELA 25 - ANÁLISE DO PERCENTUAL DE MACRÓFAGOS QUE FAGOCITARAM LEVEDURA <i>SACCILIROMYCES CEREVISIAE</i> QUANDO EXPOSTOS AO ETANOL E AO ZINCO EM CULTURA CELULAR POR 24 HORAS .....	80
TABELA 26 - ANÁLISE DO ÍNDICE FAGOCÍTICO EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS EXPOSTOS AO ETANOL E AO ZINCO EM CULTURA CELULAR POR 24 HORAS .....	82

## LISTA DE GRÁFICOS

FIGURA 1- EFEITO DO ETANOL SOBRE A FAGOCITOSE DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS EM CULTURA CELULAR POR 24 HORAS .....	40
FIGURA 2- EFEITO DO ETANOL SOBRE O ÍNDICE FAGOCÍTICO DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS EM CULTURA CELULAR POR 24 HORAS .....	41
FIGURA 3- EFEITO DA ÁGUA (CONTROLE) SOBRE A FAGOCITOSE DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS EM CULTURA CELULAR POR 24 HORAS .....	43
FIGURA 4- EFEITO DA ÁGUA (CONTROLE) SOBRE O ÍNDICE FAGOCÍTICO DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS EM CULTURA CELULAR POR 24 HORAS .....	44
FIGURA 5 - EFEITO DO ETANOL OU DA ÁGUA (CONTROLE) SOBRE A FAGOCITOSE DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS EM CULTURA CELULAR POR 24 HORAS .....	46
FIGURA 6- EFEITO DO ETANOL OU DA ÁGUA (CONTROLE) SOBRE O ÍNDICE FAGOCÍTICO DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS EM CULTURA CELULAR POR 24 HORAS .....	47
FIGURA 7 - EFEITO DA VITAMINA C SOBRE A FAGOCITOSE DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS EM CULTURA CELULAR POR 24 HORAS .....	49
FIGURA 8 - EFEITO DA VITAMINA C SOBRE O ÍNDICE FAGOCÍTICO DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS EM CULTURA CELULAR POR 24 HORAS .....	50
FIGURA 9 - EFEITO DO ETANOL E DA VITAMINA C SOBRE A FAGOCITOSE DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS EM CULTURA CELULAR POR 24 HORAS .....	52
FIGURA 10 - EFEITO DO ETANOL E DA VITAMINA C SOBRE O ÍNDICE FAGOCÍTICO DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS EM CULTURA CELULAR POR 24 HORAS .....	54
FIGURA 11 - EFEITO DA VITAMINA A SOBRE A FAGOCITOSE DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS EM CULTURA CELULAR POR 24 HORAS .....	55
FIGURA 12 - EFEITO DA VITAMINA A SOBRE O ÍNDICE FAGOCÍTICO DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS EM CULTURA CELULAR POR 24 HORAS .....	57
FIGURA 13 - EFEITO DO ETANOL E DA VITAMINA A SOBRE A FAGOCITOSE DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS EM CULTURA CELULAR POR 24 HORAS .....	59
FIGURA 14 - EFEITO DO ETANOL E DA VITAMINA A SOBRE O ÍNDICE FAGOCÍTICO DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS EM CULTURA CELULAR POR 24 HORAS .....	61
FIGURA 15 - EFEITO DA VITAMINA D <sub>3</sub> SOBRE A FAGOCITOSE DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS EM CULTURA CELULAR POR 24 HORAS .....	63
FIGURA 16 - EFEITO DA VITAMINA D <sub>3</sub> SOBRE O ÍNDICE FAGOCÍTICO DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS EM CULTURA CELULAR POR 24 HORAS .....	64
FIGURA 17 - EFEITO DO ETANOL E DA VITAMINA D <sub>3</sub> SOBRE A FAGOCITOSE DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS EM CULTURA CELULAR POR 24 HORAS .....	66

FIGURA 18 - EFEITO DO ETANOL E DA VITAMINA D <sub>3</sub> SOBRE O ÍNDICE FAGOCÍTICO DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS EM CULTURA CELULAR POR 24 HORAS .....	68
FIGURA 19 - EFEITO DA VITAMINA B <sub>12</sub> SOBRE A FAGOCITOSE DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS EM CULTURA CELULAR POR 24 HORAS .....	69
FIGURA 20 - EFEITO DA VITAMINA B <sub>12</sub> SOBRE O ÍNDICE FAGOCÍTICO DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS EM CULTURA CELULAR POR 24 HORAS .....	71
FIGURA 21 - EFEITO DO ETANOL E DA VITAMINA B <sub>12</sub> SOBRE A FAGOCITOSE DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS EM CULTURA CELULAR POR 24 HORAS .....	73
FIGURA 22 - EFEITO DO ETANOL E DA VITAMINA B <sub>12</sub> SOBRE O ÍNDICE FAGOCÍTICO DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS EM CULTURA CELULAR POR 24 HORAS .....	75
FIGURA 23 - EFEITO DO ZINCO SOBRE A FAGOCITOSE DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS EM CULTURA CELULAR POR 24 HORAS .....	77
FIGURA 24 - EFEITO DO ZINCO SOBRE O ÍNDICE FAGOCÍTICO DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS EM CULTURA CELULAR POR 24 HORAS .....	79
FIGURA 25 - EFEITO DO ETANOL E DO ZINCO SOBRE A FAGOCITOSE DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS EM CULTURA CELULAR POR 24 HORAS .....	81
FIGURA 26 - EFEITO DO ETANOL E DO ZINCO SOBRE O ÍNDICE FAGOCÍTICO DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS EM CULTURA CELULAR POR 24 HORAS .....	83

## LISTA DE SIGLAS

ADH	- Álcool desidrogenase
ATP	- Adenosina trifosfato
CFU	- “Unidade Formadora de Colônia”
CFU-GEMM	- “Unidade Formadora de Colônia” - Granulócitos, Eritrócitos, Monócitos e Megacariócitos
CFU-GM	- “Unidade Formadora de Colônia” - Granulócitos e Monócitos
CSF	- Fatores Estimuladores de Colônia
DME	- Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium (meio de cultura)
DNA	- Ácido desoxirribonucléico
epm	- erro padrão da média
fMLP	- N - formil - metionina - leucina - fenilalanina
HSC	- Células-tronco hematopoiéticas (stem cell)
MET	- Microscópio Eletrônico de Transmissão
mM	- milimolar
μl	- microlitro
NADH	- Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo reduzida
PBS	- Salina Tamponada com Fosfatos (phosphates Buffered Saline)
pH	- potencial hidrogeniônico
PMN	- polimorfonuclear
RNA	- Ácido ribonucléico
SFB	- Soro Fetal Bovino

## RESUMO

Esta pesquisa foi desenvolvida com base no alcoolismo e seu efeito sobre alguns aspectos nutricionais. O prejuízo metabólico ocasionado pelo etanol faz com que muitas vitaminas e micronutrientes não sejam absorvidos adequadamente pelo organismo; e a ação direta do etanol, como também, a deficiência nutricional, afetam o sistema imune. Devido suas características, o macrófago foi escolhido como modelo celular para esta pesquisa. O objetivo deste estudo foi avaliar a resposta fagocitária de macrófagos peritoneais de camundongos após incubação com etanol em condições de cultura celular, e também, avaliar a resposta fagocitária de macrófagos após exposição às vitaminas A, B<sub>12</sub>, C e D<sub>3</sub> e ao microelemento zinco. E ainda, numa terceira etapa, avaliar a resposta fagocitária de macrófagos expostos ao etanol e microelementos, concomitantemente. A resposta fagocitária foi avaliada pelo percentual de macrófagos que fagocitaram leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) e pelo índice fagocítico. Os macrófagos foram expostos a quatro diferentes concentrações de etanol (66, 132, 198 e 264mM) e a três diferentes concentrações de vitamina A, B<sub>12</sub>, C e D<sub>3</sub> e microelemento zinco. Conclui-se que o etanol não exerceu efeito significativo sobre a resposta fagocitária; mas, em relação ao índice fagocítico, à medida que a concentração de etanol aumentou, o índice fagocítico sofreu redução. A vitamina C não afetou a fagocitose, porém, o índice fagocítico mostrou-se reduzido. Quando a vitamina C foi associada ao etanol, a resposta fagocitária também não foi alterada; mas em relação ao índice fagocítico, após exposição à maior concentração de etanol, houve aumento significativo. A vitamina A não exerceu efeito significativo na resposta fagocitária; mas, em associação ao etanol, houve uma melhora na resposta fagocitária. Pode-se sugerir que a vitamina A exerça um efeito superior em alcoolistas do que em indivíduos que não são alcoolistas. A vitamina D<sub>3</sub> isolada e associada ao etanol, não promoveu efeito sobre a resposta fagocitária. A vitamina B<sub>12</sub> isolada e associada ao etanol, também não promoveu alterações significativas em relação à resposta fagocitária. O zinco melhorou a resposta fagocitária numa concentração mínima (0.000001mM); a medida que a concentração de zinco aumentou, a resposta fagocitária foi reduzida. O etanol associado ao zinco, pode ter interferido na utilização de zinco por macrófagos em relação aos mecanismos de fagocitose. Foi verificado que, após a adição de etanol ao meio, a resposta fagocitária não foi mantida, mesmo em concentrações baixas de zinco.

## ABSTRACT

This research was developed to evaluate the effects of alcoholism on some nutritional aspects. Ethanol causes a metabolic damage, and consequently many vitamins and micronutrients are not adequately absorbed by the organism; the direct action of ethanol, as well as the nutritional deficiency affect the immune system. Due to its characteristics, the macrophage was chosen as the cell model for this research. The aim of this study was firstly to evaluate the phagocitary response of peritoneal macrophages of mice after incubation with ethanol in cell cultures and secondly to evaluate the phagocitary response of macrophages after exposure to vitamins A, B<sub>12</sub>, C and D<sub>3</sub>, and to the microelement zinc. The third trial aimed to analyze the effects of a simultaneous exposure to ethanol and microelements on the phagocytic activity of macrophages in cell culture. The phagocitary response was evaluated by the percentage of macrophages that phagocytosed yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) and by the phagocytic index. The macrophages were exposed to four different concentrations of ethanol (66, 132, 198 and 264mM) and to three different concentrations of vitamin A, B<sub>12</sub>, C and D<sub>3</sub>, and to the microelement zinc. The conclusion is that ethanol did not show significant effect over the phagocitary response but, in relation to the phagocytic index. When the ethanol concentration was raised, the phagocytic index was reduced. Vitamin C did not affect phagocytosis, although the phagocytic index was reduced. When vitamin C was associated to ethanol, the phagocitary response was not altered either; but in relation to the phagocytic index, after exposure to a higher concentration of ethanol, there was a significant raise. Vitamin A did not show significant effect over the phagocitary response; but when associated with ethanol, there was an improvement on the phagocitary response. It may be suggested that vitamin A shows a higher effect on alcoholics than on individuals who are not alcoholics. Vitamin D<sub>3</sub> isolated and associated to ethanol did not show an effect over the phagocitary response. Vitamin B<sub>12</sub> isolated and associated to ethanol did not show any significant alterations in relation to the phagocitary response either. Zinc improved the phagocitary response in a minimal concentration (0.000001mM); When the zinc concentration was increased, the phagocitary response decreased. Ethanol associated to zinc may have interfered in the utilization of zinc by macrophages in relation to the phagocytic mechanisms. It was concluded that, after the adding of ethanol to the medium, the phagocitary response was not maintained, even in low zinc concentrations.

## 1 INTRODUÇÃO

O macrófago é um dos tipos celulares constituintes do sistema imune, e uma das principais células com função fagocitária. Desempenha diversas funções, incluindo internalização (fagocitose) de partículas estranhas, destruição de microrganismos e células tumorais, como também, debris celulares, e secreção de prostaglandinas e citocinas que regulam a atividade de linfócitos e outros macrófagos (QURESHI, 1998). Desta forma, os macrófagos influenciam quase todos os aspectos da resposta imune (ROITT; BROSTOFF; MALE, 1999).

Essa pesquisa foi desenvolvida baseada na problemática do alcoolismo, que é uma patologia social e necessita de tratamento em todas as suas abordagens. O álcool é a segunda droga psicoativa mais consumida no mundo, levando a dependência química e desencadeando diversas doenças (BITTENCOURT, 2000).

Em decorrência do prejuízo metabólico e nutricional ocasionado pelo etanol, muitas vitaminas e micronutrientes, não são absorvidos adequadamente pelo organismo. E como o alcoolista, muitas vezes, deixa de se alimentar adequadamente, suprimindo suas necessidades calóricas, pelo consumo de bebidas alcoólicas de forma abusiva, passa a substituir as calorias que deveriam ser provenientes dos alimentos, por calorias “vazias”, provenientes do etanol, levando à depleção de macro e microelementos fundamentais à saúde. Assim sendo, os órgãos e sistemas afetados não exercem suas funções adequadamente e ocorre prejuízo do organismo como um todo. Um dos sistemas afetados tanto pela ação direta do etanol como por deficiência nutricional, é o sistema imune, e tem sido demonstrado que o sistema imune é mais sensível do que outros sistemas em relação as deficiências de vitamina na dieta (DEL RIO et al., 1998). Sabe-se que após meses de abstinência alcoólica, quando o indivíduo está em reabilitação terapêutica, ainda ocorre supressão de funções imunes (WATSON et al., 1988). Portanto, torna-se necessário verificar se a suplementação com micronutrientes aumenta a resposta celular, em relação à função de fagocitose.

O termo alcoólatra está sendo substituído por alcoolista junto às instituições que desenvolvem terapias de recuperação de portadores deste problema, a fim de evitar o estigma e o preconceito vinculados ao termo alcoólatra.

Nesta pesquisa, o macrófago, mantido em cultura celular, foi o modelo escolhido para avaliação da resposta fagocitária, após exposição ao etanol e vitaminas A, B<sub>12</sub>, C e D<sub>3</sub> e ao microelemento zinco; sendo que nesta primeira etapa, o macrófago foi exposto a cada elemento isoladamente. Numa segunda etapa, procedeu-se à incubação concomitante com etanol e vitaminas, como também, com etanol e zinco.

A escolha do macrófago como modelo celular justifica-se por suas características, pois os mesmos podem ser isolados de qualquer tecido ou fluido corporal, estando comumente separados de linfócitos e outros contaminantes, e também, por aderirem fortemente a superfícies de vidro ou plástico (KLASING, 1998). E ainda, por permitir fácil acompanhamento de suas características ao microscópio, como, adesão, espriamento, brilho e ausência de contaminantes, que possibilitam definir o momento adequado da introdução de novos componentes ao meio de cultura.

O objetivo geral desta pesquisa foi avaliar a resposta fagocitária de macrófagos peritoneais de camundongos mantidos em condições de cultura celular, após exposição ao etanol e micronutrientes.

E os objetivos específicos foram:

- a) reproduzir *in vitro* a atuação do etanol em relação a resposta fagocitária de macrófagos;
- b) avaliar o percentual de macrófagos que fagocitaram leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*);
- c) avaliar o índice fagocítico, que é um índice que demonstra quantas leveduras em média foram fagocitadas por macrófago;

- d) avaliar a resposta fagocitária de macrófagos peritoneais de camundongos mantidos em cultura celular, após exposição às vitaminas A, B<sub>12</sub>, C e D<sub>3</sub> e ao microelemento zinco, através do percentual de macrófagos que fagocitaram leveduras e do índice fagocítico;
- e) e numa terceira etapa, avaliar a resposta fagocitária de macrófagos expostos ao etanol e microelementos concomitantemente;
- f) comparar os resultados obtidos nestas três etapas de avaliação, com os resultados obtidos junto aos grupos controle, sendo dois tipos de grupos controle:
- o primeiro, composto por macrófagos que não foram expostos a nenhum elemento;
  - e para o segundo grupo controle, foi acrescentado ao meio de cultura o volume equivalente do diluente do etanol e micronutrientes, ou seja, água e PBS.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 MACRÓFAGOS

Os macrófagos constituem células do sistema imune que desempenham função de defesa no organismo, participando ativamente dos mecanismos fisiológicos de defesa contra a invasão de corpos estranhos (AUGER; ROSS, 1992, p. 1).

Existem dois tipos de resposta a invasão por um patógeno, a imunidade inata, e a resposta imune adaptativa. Os mecanismos da imunidade inata atuam em primeira instância, estão sempre presentes e podem ser trazidos rapidamente à ação, mas nem sempre tem a eficácia de eliminar a infecção. Nestas circunstâncias a resposta imune adaptativa é de fundamental importância (ROITT; BROSTOFF; MALE, 1999, p. 1-2).

A imunidade inata usa mecanismos de reconhecimento moleculares gerais para detectar a presença de bactérias e vírus, e não conduz à imunidade à longo prazo para aquele patógeno em particular. A resposta imune adaptativa, em contraste, focaliza-se especificamente naquele patógeno e conduz a uma condição de proteção duradoura. Embora os mecanismos de reconhecimento nas respostas imunes inatas e adaptativas sejam diferentes, os meios para destruição de patógenos após a identificação são os mesmos em ambas as respostas (ROITT; BROSTOFF; MALE, 1999, p. 2-3).

As células responsáveis pelas respostas imunes são: linfócitos T e linfócitos B, células NK (*natural killer*), células dendríticas, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, mastócitos, monócitos e macrófagos (PARHAM, 2000).

Os macrófagos são células responsáveis pela primeira linha de defesa imunológica do organismo contra agentes patogênicos (DEL RIO et al., 1998, p. 872), desempenham papel principal na defesa do organismo tanto por imunidade inata como

por imunidade adquirida (UNANUE; ALLEN,<sup>1</sup> citados por DIETERT; GOLEMBOSKI, 1987).

Os monócitos e macrófagos têm sido considerados como principais células indutoras da resposta imune, caracterizando-se como células apresentadoras de antígeno aos linfócitos. Estudos em cultura de células linfóides, revelam que a resposta dos anticorpos à maioria dos antígenos, é anulada em grande parte, quando não há presença de macrófagos. Em protocolos experimentais, este efeito foi revertido após adição de macrófagos (ROITT; BROSTOFF; MALE, 1999, p. 156).

Os macrófagos são fundamentais na regulação do sistema imune, porque atuam na defesa local e sistêmica, desde os estágios iniciais por invasão de microorganismos ou por injúria tecidual, visando a homeostasia do organismo. Os macrófagos iniciam uma série complexa de ajustes celulares e bioquímicos. Eles são a chave regulatória do sistema imune, envolvidos na iniciação e no direcionamento da resposta imune e inflamatória (KLASING, 1998, p. 983).

O processo de diferenciação dos macrófagos foi descrito por TORMEY et al. (1997, p. 463), em que macrófagos maduros originam-se de monócitos. Tem sido demonstrado que a primeira célula progenitora originada da HSC, *stem cell* é a unidade formadora de colônia (CFU), que pode originar granulócitos, eritrócitos, monócitos e megacariócitos (CFU-GEMM). O desenvolvimento destas células até o estágio de maturação total ocorre sob a influência de fatores estimuladores de colônias (CSF) e várias interleucinas. A célula CFU-GM é a precursora dos neutrófilos e dos fagócitos mononucleares (ROITT; BROSTOFF; MALE, 1999, p. 156). Originam-se, portanto, na medula óssea e apresentam, durante seu processo de diferenciação, poucas etapas intermediárias entre as formas imaturas e as formas maduras (MELLO AIRES, 1999, p. 132).

---

<sup>1</sup> UNANUE, E. R; ALLEN, P. M. The basis for the immunoregulatory role of macrophages and other accessory cells. *Science*, London, p. 236-551, 1987.

A CFU-GM direcionada para a via monocitária origina, inicialmente, monoblastos proliferantes, que se diferenciam em pró-monócitos e finalmente em monócitos circulantes maduros (ROITT; BROSTOFF; MALE, 1999, p. 156). A medula óssea contém macrófagos residentes, assim como seus precursores (AUGER; ROSS, 1992, p. 3).

Monócitos recentemente formados permanecem na medula óssea por tempo menor que 24h antes de entrar na corrente sanguínea. Estudo realizado em camundongos mostrou que estes monócitos em circunstâncias normais circulam durante 17,5 a 25h; e no homem por cerca de 70 horas. Cerca de 1-6% das células nucleadas encontradas na circulação sanguínea são monócitos (AUGER; ROSS, 1992, p. 4-5).

A migração de monócitos do sangue periférico para os tecidos onde se diferenciam em macrófagos, envolve aderência ao endotélio, migração entre células endoteliais, e subsequente passagem através de estruturas subendoteliais, processo dependente de moléculas de adesão. A proporção de monócitos que migram para os órgãos é aparentemente ao acaso, porém corresponde ao tamanho do órgão. Os macrófagos permanecem nos tecidos e cavidades do corpo por vários meses, não constituindo uma população constante de células, mas são regularmente renovados de acordo com a afluência de monócitos (AUGER; ROSS, 1992, p. 5-7).

Com a diferenciação dos monócitos, ocorre mudança do fenótipo e conseqüentemente, parece haver mudança funcional, mantendo assim a relação entre expressão de antígeno e atividade nas populações de macrófagos maduros (TORMEY et al., 1997, p. 463).

Na proximidade de todos os tecidos, órgãos e cavidades revestidas por serosas, está presente uma população de macrófagos residentes. Independentemente de sua localização ou morfologia, os macrófagos associados aos tecidos pertencem a uma mesma linhagem conhecida como sistema mononuclear fagocitário, que juntamente com neutrófilos são as principais células com função fagocitária. Os macrófagos,

entretanto, são muito maiores e vivem mais tempo do que neutrófilos (ALBERTS et al., 1997, p. 1163).

O macrófago mede entre 25-50  $\mu\text{m}$  de diâmetro, tem forma irregular, núcleo irregular e excentricamente posicionado, com um ou dois nucléolos e cromatina dispersa. Apresenta Complexo de Golgi bem desenvolvido em posição justanuclear, número variável de vesículas de endocitose e grande número de mitocôndrias. A superfície da membrana apresenta-se irregular, com microvilos, e o citoesqueleto bem desenvolvido, circundando o núcleo e estendendo-se até a periferia da célula (SCHUTZE et al., 1989, p. 3562; DiPERSIO; GOLDE; GASSON, 1990, p. 63; SHERR, 1990, p. 46). Expressa grande quantidade de receptores de superfície, envolvidos nas interações desta célula com o meio extracelular e com o controle de sua atividade (crescimento, diferenciação, ativação, reconhecimento, fagocitose, migração e secreção). Estes receptores fazem parte de diversas famílias de proteínas, incluindo integrinas, imunoglobulinas e receptores para citocinas, dentre outros (PAPADIMITRIOU; ASHMAN, 1989, p. 351; STEIN; KESHAV, 1992, p. 22).

Macrófagos representam efetiva defesa contra a invasão de uma larga variedade de microrganismos, inclusive bactérias, fungos, vírus, e protozoários. Desempenham uma larga variedade de funções, incluindo internalização (fagocitose) de partículas estranhas, destruição de bactérias e células tumorais, como também debris celulares, e secreção de prostaglandinas e citocinas que regulam a atividade de linfócitos e outros macrófagos (QURESHI, 1998, p. 978). Assim sendo, os macrófagos influenciam quase todos os aspectos da resposta imunológica. Inicialmente, atuam como mecanismo protetor rápido capaz de responder antes que ocorra a amplificação mediada pela célula T. Posteriormente, os macrófagos podem tomar parte na iniciação da ativação das células T através do processamento e da apresentação de antígenos. Finalmente, são importantes como células inflamatórias, tumorocidas e microbicidas na fase efetora da resposta celular, após a ativação mediada por célula T (ROITT; BROSTOFF; MALE, 1999, p. 132).

O macrófago tem capacidade para sintetizar e segregar o maior número de moléculas de comunicação do que qualquer outro tipo de célula. Dentre estas moléculas de comunicação incluem-se: citocinas, inibidores de citocinas, hormônios endócrinos, eicosanóides, neurotransmissores, e produtos intermediários de oxidação. Estas moléculas podem agir no próprio macrófago que as segregou (mecanismo autócrino), em células vizinhas (parácrino), ou podem entrar na circulação sanguínea e atuar sistemicamente (endócrino) (KLASING, 1998, p. 984).

Para a realização de suas funções no organismo, o macrófago apresenta diversos mecanismos. Dentre eles, tem papel importante a fagocitose, que consiste num processo extremamente complexo que inclui a migração da célula em direção ao agente e o reconhecimento, através de receptores de membrana, da partícula ou microorganismo a ser internalizado. A complexidade da fagocitose reside tanto na diversidade de receptores como também na variedade de microrganismos, que influenciam como serão internalizados. Apesar da complexidade associada com diferentes mecanismos fagocíticos, várias características que se seguem são compartilhadas. A internalização da partícula é iniciada pela interação de receptores específicos na superfície do fagócito com ligantes na superfície da partícula. Isto conduz a polimerização de actina no local de ingestão e a internalização da partícula, que é um mecanismo dependente de actina. Após internalização, a actina é despolimerizada do fagossomo, que amadurece por uma série de eventos de fusão e fissão, culminando na formação do fagossomo maduro. A maturação do fagossomo requer a interação coordenada de actina e tubulina (ADEREM; UNDERHILL, 1999, p. 594-595). O processamento do material fagocitado pelo macrófago, ocorre através da formação de fagolisossomos (fagossomo à qual uniu-se um lisossomo, carregado de enzimas) e a posterior extrusão dos fragmentos, num processo de exocitose. A fagocitose pode ocorrer numa ampla gama de pH (ADAMS; HAMILTON, 1992, p. 79). O processo exige a participação ativa do citoesqueleto, mediada por alterações no metabolismo interno, que são moduladas pela ativação de segundos-mensageiros, e

que promovem, alterações no conteúdo de cálcio intracelular (METCHNIKOFF<sup>2</sup>, citado por AUGER; ROSS, 1992; STEIN; KESHAV, 1992, p. 20) ou outros mensageiros intracelulares. Atualmente tem se ressaltado o papel dos fosfolipídeos, particularmente esfingosina, na sinalização celular (PYNE; PYNE, 2000, p. 385). O processamento intracelular depende da acidificação dos componentes do sistema endossômico-lisossômico (NICASTRI, 2001). Há vários mecanismos que controlam a acidificação do fagossomo, exercendo influência direta na patogenicidade do microrganismo e portanto, na modulação da resposta imune.

RUSSEL (1995) fez um estudo comparativo entre os vacúolos formados após incubação com *Leishmania* e *Mycobacterium*, demonstrando que macrófagos ativados são um pouco maiores do que os não ativados, principalmente devido ao aumento de volume citoplasmático, e são muito mais eficientes em destruir bactérias ou outros patógenos. A variabilidade de estímulos que podem ativar macrófagos é muito grande (LABRO, 2000). Partículas opsonizadas têm maior eficácia de internalização e são mais eficazmente fagocitadas (QURESHI, 1998, p. 978-979).

O resultado da interação do macrófago com o patógeno depende de vários fatores, incluindo, a fase de ativação, a natureza do agente infeccioso, a função do macrófago de acordo com o genótipo, como também, os fatores nutricionais e ambientais que podem modular a ativação do macrófago e sua função (QURESHI, 1998, p. 978).

Em macrófagos, a fagocitose mediada por receptores pode ser estudada por meio da utilização de leveduras não patogênicas como *Saccharomyces cerevisiae* (BUCHI; SOUZA, 1992; BUCHI; SOUTO-PADRON; SOUZA, 1993). A internalização de leveduras ocorre através de receptores de manose-fucose (WARR, 1980, 737-745; FELIPE; OLIVEIRA-CASTRO, 1987, p. 79-91), que reconhecem oligossacarídeos cujas cadeias terminais correspondem a manose, fucose ou N-acetilglucosamina, que,

---

<sup>2</sup> METCHNIKOFF, E. *Immunity in infective disease*. Cambridge University Press, 1905.

por sua vez, ligam-se a glicoproteínas e as internalizam (STAHL et al., 1978; VILEMAN; LENNARTZ; STAHL, 1986; TIETSE; SCHLESINGER; STAHL, 1982). O comportamento destes receptores pode ser modificado, em diferentes níveis, devido à ação de substâncias exógenas. Este modelo de interação macrófago-levedura, permite avaliar aspectos diversos da contaminação celular por xenobióticos (CIPRIANO, 1994, p. 2). Atualmente têm-se usado muitos protocolos de purificação e isolamento de fagossomos (DEFACQUE et al., 2000) a partir de cultura de macrófagos da linhagem J774.

## 2.2 CULTURA CELULAR

A cultura celular oferece facilidade e homogeneidade de condições oferecidas ao experimento, e pelo dano que o alcoolismo experimental em animal íntegro poderia causar, em termos de mortalidade, torna-se mais adequada. A cultura celular proporciona uma população relativamente homogênea de células, podendo então ser analisada diretamente.

Dadas as condições apropriadas, a maior parte das células vegetais e animais poderão viver, multiplicar-se e até mesmo expressar propriedades diferenciadas em uma placa de cultura. As células podem ser observadas sob o microscópio ou analisadas bioquimicamente, e os efeitos de adição ou remoção de moléculas específicas, podem ser pesquisados (ALBERTS et al., 1997, p. 158).

Macrófagos podem ser isolados de qualquer tecido ou fluido corporal, e estão comumente separados de linfócitos e outros contaminantes por aderirem fortemente a superfícies de vidro ou plástico (KLASING, 1998, p. 984); e, além disso, fagocitam ativamente organismos ou células tumorais *in vitro* (ROIT; BROSTOFF; MALE, 1999, p.132). Macrófagos peritoneais também são adequados para estudos dos fenômenos dos efeitos de drogas e seu modo de ação (LACAVA, 1991).

## 2.3 ATUAÇÃO DO ETANOL NO ORGANISMO HUMANO

As características físico-químicas e biológicas do etanol, de absorção, difusão e metabolização, concorrem para a sua distribuição a todas as células de todos os tecidos do organismo, devido a sua completa miscibilidade em meio aquoso. Um dos aspectos mais interessantes da atuação do etanol a nível biológico é a sua participação nos processos de produção de energia e correspondente captação em forma de ligações altamente energéticas de fosfato, e seus efeitos nos processos oxidativos de fosforilação que se acoplam à maquinaria energética da célula (GRAF, 1988, p. 37).

O etanol pode ser usado como fonte de energia útil quando perfaz menos de 25% da entrada de energia total. Em níveis mais altos, o etanol tende a ser metabolizado por vias que não produzem ATP. Neste caso, é metabolizado por via que principalmente gera calor.

Quantidade superior a 90% do etanol é metabolizado, principalmente no fígado, pela ação catalítica das enzimas álcool desidrogenase, aldeído desidrogenase e o sistema de oxidação microsômico do etanol; e são eliminados 2 a 10% inalterados pelos pulmões ou urina. (BRODY, 1994, p. 202-203).

A enzima álcool desidrogenase, é citosólica, catalisa a oxidação do etanol em acetaldeído com a geração de NADH. A energia deste NADH é transferida para a mitocôndria. A álcool desidrogenase é uma metaloenzima que contém quatro átomos de zinco por molécula (BRODY, 1994, p. 202). A perda de dois átomos de zinco resulta em completo desaparecimento de sua atividade catalítica (DAS; BURCH; HAHN, 1984, p. 612). Desta forma, a deficiência de zinco, altera a função da ADH e conseqüentemente o metabolismo de etanol, o que ocorre com freqüência em alcoolistas, pois estes constituem um grupo de risco para desenvolver deficiência de zinco (GRAF, 1988, p. 54).

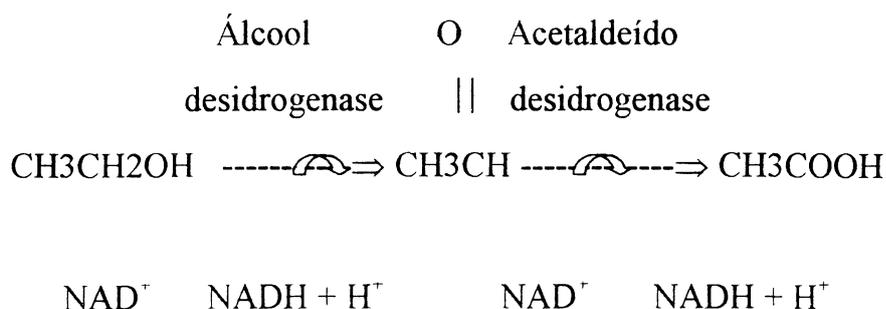


FIGURA 1 - FORMAÇÃO E OXIDAÇÃO DE ACETALDEÍDO

A maioria do acetaldeído é oxidada na mitocôndria através da enzima aldeído desidrogenase, entretanto também existe uma versão citosólica da enzima.

Uma segunda via de oxidação de etanol torna-se importante com concentrações elevadas de etanol ou com alcoolismo crônico. Esta via é chamada de sistema de oxidação microssômico do etanol, e as enzimas deste sistema estão localizadas principalmente no retículo endoplasmático liso do hepatócito. Uma distinção deve ser feita entre as ações da ADH e SOME (sistema de oxidação microssomial do etanol) na produção de energia utilizável. Na primeira, o resultado em geração de  $\text{NADH} + \text{H}^+$  pode ser usado para produzir ATP na mitocôndria. Porém, o segundo caso, resulta em um produto que não pode ser usado para gerar ATP (BRODY, 1994, p. 203-204).

O etanol, como já foi citado anteriormente, é a segunda droga psicoativa mais consumida em todo o mundo (BITTENCOURT, 2000) e a melhor conhecida em relação aos efeitos sobre o corpo humano. Poucos são os órgãos cujo comprometimento pelo uso crônico desta substância não esteja descrito. A sua ação nociva ao organismo é multifatorial. Está ligada aos efeitos tóxicos diretos do etanol e seus metabólitos (principalmente o acetaldeído e lactato), às alterações celulares (membranas, citoplasma, mitocôndrias, Complexo de Golgi, retículo endoplasmático) secundárias ao seu metabolismo, a fatores genéticos, imunológicos e nutricionais (FONSECA, 1993, p. 154-155).

O uso abusivo de etanol pode incidir numa desnutrição calórico-proteica que

contribui na redução da imunidade celular (GRAF, 1988, p. 55), sendo classificada como uma desnutrição de causa primária pelo etanol (LIEBER, 1989, p. 203). Quanto ao perfil nutricional, além de deficiência de proteínas, ocorrem também deficiências de vitaminas, eletrólitos e oligoelementos. Essas deficiências podem ser reforçadas, ainda, pela atuação do etanol no intestino, que pode desencadear diarreia crônica (FONSECA, 1993, p. 154-155). Mesmo uma nutrição adequada e balanceada em alcoolistas, não os preserva do processo de desnutrição, porque o etanol prejudica a absorção e utilização de nutrientes, que em conjunto com diarreia, vômitos, anorexia, gastrite ou úlceras, são efeitos deletérios que acarretam num processo de desnutrição classificada como secundária (FEINMAN, 1989, p. 207).

Os efeitos do consumo de álcool tanto agudo como crônico em humanos, modelos animais e sistemas *in vitro*, em relação a defesa do organismo e imunidade, causam anormalidades funcionais em linfócitos T e B e macrófagos, resultando em respostas imunes alteradas após uso de etanol. Constata-se ainda o aumento da susceptibilidade do indivíduo a infecções causadas por patógenos (SZABO, 1999, p. 830).

Um dos aspectos mais importantes e relevantes são os recentes dados mostrando que o etanol altera seletiva e especificamente a função de várias proteínas de membrana (GONZALES; HOFFMAN, 1991; SAMSON; HARRIS, 1992<sup>3</sup>, citados por BITTEENCOURT, 2000). Portanto, vários pesquisadores desafiam a hipótese, chamada de “hipótese de membrana” (TABAKOFF; HOFFMAN, 1987<sup>4</sup>, citados por BITTEENCOURT, 2000), onde o etanol é considerado “uma droga não-específica” e

---

<sup>3</sup> GONZALES, R. A.; HOFFMAN, P. L. Receptor-gated ion channels may be selective CNS targets for ethanol. *Trends Pharmacol Sci.*, Kidlington, v. 12, p. 1-3, 1991; SAMSON, H. H.; HARRIS, R. A. neurobiology of alcohol abuse. *Trends Pharmacol Sci.*, Kidlington, v. 13, p. 206-211, 1992..

<sup>4</sup> TABAKOFF, B.; HOFFMAN, P. L. Biochemical pharmacology of ethanol. In: MELTZER, H. Y. (Ed.). *Psychopharmacology: the third generation of progress*. New York: Raven Press, 1987. p. 1521-1526.

que produz certos efeitos fisiopatológicos, desequilibrando os componentes lipídicos das membranas celulares.

Fundamentando-se nestes efeitos, a pesquisa de NILSSON et al. (1996) explorou *in vitro* a possibilidade dos efeitos inibitórios do etanol nas respostas funcionais de neutrófilos, pois o etanol promove inibição do metabolismo oxidativo de PMN, devido sua atuação em receptores de superfície de membrana, interferindo na expressão ou função de tais receptores. Dentro deste contexto, um dos aspectos estudados foi a fagocitose, caracterizada por uma resposta funcional dependente de membrana, mas que não foi afetada. Enquanto, na pesquisa de AROOR e BAKER (1998), foi feita a relação *in vitro* entre o efeito do etanol e a fagocitose em microglia, constatando-se uma significativa supressão da fagocitose após incubação com etanol e *E. coli*. A microglia é caracterizada como tipo celular da linhagem monócito-macrófago que entra no Sistema Nervoso Central numa fase inicial do desenvolvimento embrionário, desta forma, assemelham-se a monócitos-macrófagos porque são fagócitos.

O uso de etanol está associado com a perda de vários tipos celulares, tanto em preparações com células isoladas, animais experimentais intactos e pacientes alcoolistas (AROOR; BAKER, 1997; BAKER; KRAMER, 1999; HIGUCHI et al., 1996<sup>5</sup>, citados por CHANG; TUCCI; BAKER, 2000). A exposição ao etanol de forma aguda ou crônica tem mostrado uma diminuição no número de macrófagos e efeito inibitório de suas funções, incluindo secreção de citocinas específicas, liberação de complexos antígeno-anticorpo, fagocitose e destruição de organismos estranhos

---

<sup>5</sup> AROOR, A. R.; BAKER, R. C. Ethanol-induced apoptosis in human HL-60 cells. *Life Sci.*, New York, v. 61, p. 2345-2350, 1997; BAKER, R. C.; KRAMER, R. E. Citotoxicity of short-chain alcohols. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, Palo Alto, v. 39, p. 127-150, 1999; HIGUCHI, H. et al. Ethanol-induced apoptosis and oxidative stress in hepatocytes. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, Baltimore, v. 20 (suppl.), p. 340A-346A, 1996.

(ANTONY et al., 1993; BAKER; JERRELLS, 1993; BAKER; KRAMER, 1993; JERRELLS et al., 1993; MAC GREGOR, 1986<sup>6</sup>, citados por CHANG; TUCCI; BAKER, 2000). O estudo de CHANG, TUCCI e BAKER (2000), demonstra que o efeito do etanol no número de macrófagos está relacionado a inibição na proliferação de macrófagos; estes autores também sugerem que o número de células decresce por um mecanismo de ação citotóxica direta do etanol sobre os macrófagos.

Foi mostrado por WATSON et al.<sup>7</sup>, citado por WATSON et al. (1988) que mesmo após meses de abstinência alcóolica em humanos, ainda ocorre supressão de funções imunes.

---

<sup>6</sup> ANTONY, V. B. et al. Alcohol-induced inhibition of alveolar macrophage oxidant release in vivo and *in vitro*. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, Baltimore, v. 17, p. 389-393, 1993; BAKER, R. C.; JERRELLS, T. R. Immunological aspects. In: GALANTER, M. (Ed.) **Recent developments in alcoholism**. New York: Plenum Press, 1993. v.11, p. 249-271 Ten Years of Progress; BAKER, R. C.; KRAMER, R. E. Citotoxicity of short-chain alcohols. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, Palo Alto, v. 39, p. 127-150, 1999; CASTRO, A.; LEFKOWITZ, D. L., LEFKOWITZ, S. S. The effect of alcohol on murine macrophage function. *Life Sci.*, New York, v. 52, p. 1585-1593, 1993; GILHUS, N. E.; MATRE, R. *In vitro* effects of ethanol on subpopulations of human blood mononuclear cells. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, Basel, v. 68, p.382-386, 1982; ISAKI, L.; GORDIS, E. Alcohol and immunology- progress and questions. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, Baltimore, v.17, p. 725-726, 1993; JERRELLS, T. R. et al. Ethanol-induced suppression of in vivo host defense mechanisms to bacterial infection. In: FRIEDMAN, H., KLEIN, T. W.; SPECTER, S. (Ed.) **Drugs of abuse, immunity, and aids**. New York: Plenum Press, 1993 e no **Advances in Experimental Medicine and Biology**, New York, v. 335 p. 153-157, 1993; MAC GREGOR, R. R. Alcohol and immune system. *JAMA*, Chicago, v. 256, p. 1474-1479, 1986.

<sup>7</sup> WATSON, R. R. et al. **Alcoholism: Clin. Exp. Res.**, Baltimore, v. 9, p. 248-254, 1985.

#### 4 VITAMINAS E MINERAIS

Várias evidências sugerem que existe uma conexão muito íntima entre nutrientes e resposta imune. Micronutrientes, elementos traço e algumas vitaminas, oferecem ótimo suporte para a função imune. Indicando que a função imune reduzida, como a avaliada *in vitro*, está vinculada ao risco de infecção e desenvolvimento de tumores *in vivo* (CUNNINGHAM-RUNDLES, 1998, p. S27). Tem sido demonstrado que o sistema imune é mais sensível do que outros sistemas em relação as deficiências de vitamina na dieta (BENDICH 1992, MEYDANE et al. 1995, CHEW 1995, JARIWALLA; HARAKEH 1996<sup>8</sup>, citados por DEL RIO et al., 1998).

A deficiência de zinco é uma ocorrência freqüente em alcoolistas, associada ou não com doenças hepáticas; pelos seguintes motivos: diminuição da ingestão dietética de zinco, absorção anormal do zinco por interferência do transportador intestinal de zinco e também por lesão inespecífica da mucosa (DAS; BURCH; HANH, 1984, p. 610).

A deficiência de zinco torna mais lenta a remoção do etanol devido sua influência na atividade da enzima álcool desidrogenase. Deste modo, produz níveis circulantes e teciduais mais elevados de etanol, durante um tempo maior. É provável que o alcoolista crônico, que se torna deficiente em zinco, apresente maior dificuldade de metabolização de etanol e esteja sujeito, portanto, a maior toxicidade. Assim, poderá operar-se um ciclo vicioso envolvendo alcoolismo progressivo, deficiência de zinco e hepatopatia precoce (OLSON et al., 1985, p. 158-159).

Muitos estudos têm sido realizados para esclarecer a relação entre o zinco e os macrófagos. Por intermédio da avaliação de algumas pesquisas, pode-se perceber que os resultados são controversos. Em algumas publicações, foi demonstrada redução

---

<sup>8</sup> BENDICH, A. J. *Nutrition*, Bethesda, v. 122, p. 601-603, 1992; MEYDANI, S. N. et al. *Am. J. Clin. Nutrition.*, Bethesda, v. 62 (suppl), p. 1462S-76S, 1995; CHEW, B. P. *J. Nutrition*, Bethesda, v. 125, p. 1804S-1808S, 1995; JARIWALLA, R. J.; HARAKEH, S. Ascorbic acid: biochemistry and biomedical cell biology. In: ROBIN-HARRIS, J. (Ed.). New York: Plenum Press, 1996. p. 215-231.

na fagocitose por macrófagos, como foi descrito por SINGH et al.<sup>9</sup> citados por SHANKAR (1992) e SALVIN et al.<sup>10</sup> citados por SHANKAR (1987), onde animais com deficiência de zinco sofreram redução em relação à fagocitose quando expostos a *Candida*. Já no trabalho de LIM, KLESIUS e DUNCAN (1996, p. 302-307), em que foram usadas várias dietas ricas em zinco, não houve influência na atividade fagocitária do macrófago, porém respostas quimiotáxicas foram significativamente mais altas. Na pesquisa de (KIDD et al., 1994<sup>11</sup>, citados por QURESHI, 1998) houve melhora na fagocitose de *Salmonella* por macrófagos, em perus jovens. Investigações apontam, porém, que altas concentrações de zinco *in vitro* inibem a ativação de macrófagos, mobilidade e fagocitose (CHVAPIL et al., 1977 e ALLEN et al., 1983<sup>12</sup> citados por SHANKAR, 1998).

Um dos objetivos da pesquisa de WIRTH, FRAKER e KIERSZENBAUM (1984), foi definir os efeitos dietéticos do zinco na fagocitose de macrófagos de ratos, que foram divididos em três grupos, de acordo com a dieta recebida durante 28 dias. Os grupos foram: ratos alimentados com dieta ausente em zinco, dieta adequada em zinco e uma dieta restrita em zinco. Para avaliar a fagocitose, os macrófagos foram incubados com partículas de látex durante uma hora a 37°C, e os resultados demonstraram, que as células provenientes de ratos que receberam a dieta ausente em zinco, apresentaram um percentual mais elevado de fagocitose, seguido pelas células

---

<sup>9</sup> SINGH, K. P. et al. Effect of zinc on immune functions and host resistance against infection and tumor challenge. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. Monticello, v. 14, p. 813-840, 1992.

<sup>10</sup> SALVIN, S. B. et al. The effect of dietary zinc and prothymosin a on cellular immune responses of RF/J mice. *Clin Immunol Immunopathol*, Orlando, v. 43, p. 281-288, 1987.

<sup>11</sup> KIDD, M. T. et al. Dietary zinc-methionine enhances mononuclear-phagocytic function in young turkeys. *Biol. Trace Element Res.*, Totowa, v. 42, p. 217-229, 1994.

<sup>12</sup> CHVAPIL, M. et al. Effect of zinc on peritoneal macrophages *in vitro*. *Infect Immunol*, v.16, p. 367-373, 1977; ALLEN, J. I. et al. Alterations in human natural killer cell activity and monocyte cytotoxicity induced by zinc deficiency. *J. Lab. Clin. Med.*, St. Louis, v. 102, p. 577-589, 1983.

do grupo que recebeu dieta restrita em zinco, e com o menor percentual, as células do grupo com dieta adequada em zinco. Portanto, a presença de zinco não aumentou a fagocitose (*in vitro*). Em outro estudo de WIRTH, FRAKER e KIERSZENBAUM (1989), os resultados apontam que macrófagos de ratos deficientes em zinco são capazes de internalizar o parasita *Trypanosoma cruzi*, mas são incapazes de destruí-los.

Na pesquisa de SCHLESINGER et al. (1993, p. 734-738) foi estudado o efeito da suplementação de zinco na função fagocítica de monócitos coletados do sangue de crianças com marasmo durante reabilitação nutricional, em relação a *Candida albicans*. Embora, seja bem conhecido, o papel do zinco na preservação da integridade de células e tecidos e a regulação da atividade funcional de células do sistema imune, como macrófagos e leucócitos (ZUKOSKY et al.,<sup>13</sup> citados por SCHLESINGER et al., 1993), os resultados desta pesquisa sugerem que a suplementação com zinco de acordo com RDA (necessidades dietéticas diárias recomendadas) possam prejudicar a função de monócitos. GHASSEMIFAR et al. (1995), investigaram algumas funções em macrófagos de ratos deficientes em zinco e macrófagos de ratos controle em período pós-operatório, e demonstraram que não houve diferença em relação à fagocitose entre estes grupos.

Desta forma, há um consenso sobre a necessidade de que estudos adicionais sejam realizados para esclarecer o mecanismo pelo qual o zinco afeta a fagocitose de macrófagos e monócitos (SHANKAR; PRASAD, 1998, p. 453S).

Para o alcoolista numa fase de abstinência com uso concomitante de suplementação de zinco, pode-se obter como resultados: regulação do apetite, pois tem efeito em relação a anorexia, aumenta sensação gustativa e função imune (MARSANO, 1989, p. 255; KRAUSE; MAHN, 1991, p. 166; FRANCO, 1992, p.

---

<sup>13</sup> ZUKOSKY, C. F. et al. Functional immobilization of peritoneal macrophages by zinc. *J. Reticuloendothel Soc.*, v. 16, p. 6, 1974.

268-269). Justifica-se a escolha do zinco para esta pesquisa pela sua importância como elemento traço essencial para a síntese de DNA e RNA e para a função de aproximadamente 200 enzimas (mantendo as relações espaciais e configuracionais necessárias para a ação enzimática) (KRAUSE; MAHAN, 1991, p. 166). Tem importante participação na estabilização da membrana (MARSANO; McCLAIN, 1989, p. 255) bem como, na função fagocitária e imunitária (FRANCO, 1992, p. 268; VIEIRA et al., 1995, p. 287; QURESHI, 1998, p. 979).

Quando as vitaminas foram isoladas e estudadas, observou-se que a deficiência de qualquer uma delas resultava em prejuízo do sistema imunológico, levando a diminuição no número de leucócitos do sangue e conseqüentemente menor resistência à infecção. As vitaminas necessárias para boa imunidade são a vitamina A, vitamina B<sub>12</sub>, o ácido pantotênico, a folacina e a vitamina C. Essas também são as vitaminas que parecem fortalecer o sistema imunológico quando ingeridas ou administradas em quantidades maiores que as normalmente recomendadas (PAULING, 1988, p. 152).

Com relação à maioria de nutrientes e micronutrientes ainda não está bem definido o mecanismo pelo qual é modulada a função de macrófagos; porém, foi comprovado que componentes dietéticos possam ter influência significativa na capacidade do modelo experimental (especificamente macrófagos), para viabilizar uma resposta imune efetiva (QURESHI, 1998, p. 980).

A vitamina A e retinóides exercem papel importante na regulação da função imunitária, já que esses componentes possam ser potencialmente agentes imunomodulatórios *in vivo* (DENNERT<sup>14</sup>, citado por KATZ et al., 1987).

A deficiência de vitamina A compromete a defesa imunitária, resultando em maior morbidade e mortalidade. A descoberta de receptores para ácido retinóico facilitaram grandemente nossa compreensão de como a vitamina A pode influenciar a

---

<sup>14</sup> DENNERT, G. Immunostimulation by retinoic acid. **Retinoids, differentiation and disease**. London: Pitman, 1985. p. 117-131 (Ciba Foundation Symposium, 113).

função imune a nível genético (SEMBA, 1998). Os níveis de vitamina A e seu metabolismo são afetados pelo consumo de etanol. Muitos alcoolistas têm suas reservas hepáticas de vitamina A reduzidas. O etanol ativa um conjunto de enzimas que converte o retinol em metabólitos solúveis em água, que sofrem alterações químicas adicionais antes de serem excretados na bile, resultando em perda líquida de vitamina A. Este sistema enzimático está localizado em certas membranas celulares (microsossomos), com a função de desintoxicar drogas e poluentes, inclusive o etanol (LEO; LIEBER, 1989, p. 250-251).

A deficiência de vitamina A pode ocorrer não somente como resultado da ingestão inadequada, mas também como resultado da absorção intestinal precária ou da conversão inadequada de provitamina A, como ocorre em doenças hepáticas. Foi demonstrado que o zinco é necessário para manter concentrações adequadas de vitamina A no plasma. Experimentos realizados com animais demonstraram que o zinco é necessário para a mobilização normal da vitamina A contida no fígado (HARPER; RODWELL; MAYES, 1982, p. 157-158).

Em relação aos macrófagos, a vitamina A e retinóides influenciam na diferenciação de monócitos a macrófagos e na função dos mesmos (SEMBA, 1998).

Diversas pesquisas demonstraram que retinóides podem modular várias funções de macrófagos, tais como: produção de IL-1 (interleucina-1) (MORIGUCHI; WERNER; WATSON<sup>15</sup>, 1985), atividade tumoricida (TACHIBANA et al.<sup>16</sup>, 1984), fagocitose e expressão do receptor Fc . Os retinóides regulam as funções celulares alterando a expressão dos genes; e esta alteração ocorre a nível de transcrição de genes

---

<sup>15</sup> MORIGUCHI, S.; WERNER, L.; WATSON, R.R. High dietary vitamin A (retinyl palmitate) and cellular immune functions in mice. *Immunology*, Oxford, v.56, p. 169, 1985, citado por DILLEHAY, D. L.; WALI, A. S.; LAMON, E. W. Effects of retinoids on macrophage function and IL-1 activity. *Journal of Leukocyte Biology*, Bethesda, v. 44, p. 353-360, 1988.

<sup>16</sup> TACHIBANA, K. et al. Stimulatory effect of vitamin A on tumoricidal activity of rat alveolar macrophages. *Br. J. Cancer*, v. 49, p. 343, 1984 citado por DILLEHAY, D. L.; WALI, A. S.; LAMON, E. W. Effects of retinoids on macrophage function and IL-1 activity. *Journal of Leukocyte Biology*, Bethesda, v. 44, p. 353-360, 1988.

específicos (DILLEHAY; WALIA; LAMON, 1988, p. 354).

No estudo de RHODES e OLIVER (1980) que pesquisaram o efeito da vitamina A e ácido retinóico na função de monócitos derivados de sangue humano, concluíram que, retinóides em concentrações fisiológicas, exercem potente efeito regulatório na função de macrófagos *in vitro*; suprimindo a expressão de receptores Fc e subsequentemente a fagocitose de células opsonizadas.

Na publicação de GOLDMAN (1984) o ácido retinóico foi testado em relação a capacidade fagocítica de diferentes linhagens de macrófagos; e nesta avaliação algumas variáveis foram importantes para o resultado final, como: tempo de exposição, diferentes tipos de substâncias a serem fagocitadas e diferentes tipos e concentrações de retinóides. Os resultados demonstraram, para a linhagem celular P388D1, que a capacidade fagocítica aumenta à medida que o ácido retinóico torna-se mais concentrado, e em relação ao tempo de exposição, pode-se dizer o mesmo, ou seja, quanto maior o tempo de exposição (nesta pesquisa, 96 horas) maior a capacidade fagocítica.

Na pesquisa de KATZ et al. (1987) que examinaram os efeitos *in vivo* da vitamina A na regulação imune e *in vitro* do ácido retinóico na função da célula acessória, por meio de células e tecidos obtidos junto a ratos que receberam dieta normal (controle) e ratos que receberam dietas contendo vitamina A ou ácido retinóico, foi confirmado histologicamente, que animais alimentados com vitamina A, tiveram aumento no número de células acessórias, incluindo células dendríticas e macrófagos.

Na pesquisa de DILLEHAY, WALI e LAMON (1988), foi comparado o efeito de três tipos distintos de retinóides sobre a fagocitose de macrófagos peritoneais de camundongos e macrófagos da linhagem (RAW 264) em cultura celular, constatou-se que, mesmo com concentrações baixas de retinóides, há aumento significativo na fagocitose. Estes autores postularam que retinóides exerçam resultado similar *in vivo*.

A vitamina B<sub>12</sub> ou cobalamina tem vários papéis fisiológicos a nível celular.

É essencial para o funcionamento normal do metabolismo de todas as células, está envolvida no metabolismo de proteínas, gorduras e carboidratos, é necessária para a síntese de ácidos nucléicos e DNA, e atua como coenzima em reações químicas celulares (KRAUSE; MAHAN, 1991, p. 129; FRANCO, 1992, p. 42-43; HARPER; RODWELL; MAYES, 1982, p. 191-192; VIEIRA et al., 1995, p. 272).

Os alcoolistas comumente apresentam deficiência de vitamina B<sub>12</sub>, ocorrendo diminuição na absorção e utilização de forma eficiente desta vitamina, já que o etanol é uma toxina em relação a vitamina B<sub>12</sub> (LIEBER, 1989, p. 201).

Na pesquisa de SKACEL e CHANARIN (1983), cuja proposta foi investigar o papel da vitamina B<sub>12</sub> na função de neutrófilos coletados de pacientes com severa deficiência de cobalamina, dentre os quais alguns eram alcoolistas, o resultado obtido apontou atividade fagocítica normal, porém, a morte intracelular do *Staphylococcus aureus* (microrganismo testado) estava prejudicada.

O mesmo resultado foi encontrado na pesquisa de SEGER et al.<sup>17</sup>, citados por SKACEL e CHANARIN (1983), onde os neutrófilos de uma criança com deficiência de TCII (transcobalamina) e com infecções recorrentes, eram incapazes de inativar e destruir *Staphylococcus aureus*, embora a atividade fagocítica estivesse normal, mas este quadro foi completamente revertido em menos de 48 horas por infusão de plasma suplementado com cobalamina.

Na pesquisa de THOMASKUTTY e LEE (1987), a atividade fagocítica de macrófagos foi estudada em ratos infectados com *Trypanosoma lewisi*, e três grupos do protocolo foram testados após o fornecimento de diferentes dietas. Um grupo recebeu dieta normal (completa), um segundo grupo recebeu dieta deficiente em vitamina B<sub>12</sub> e o terceiro grupo (controle) recebeu dieta restrita em calorias; independente do tipo de dieta, a infecção com *Trypanosoma lewisi* propiciou aumento da fagocitose por macrófagos quando expostos a partículas de látex. Mas, tanto a

---

<sup>17</sup> SEGER, R. et al. Granulocyte dysfunction in transcobalamin II deficiency responding to leucovorin or hydroxocobalamin-plasma transfusion. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, Ithaca, v. 3, p. 3-9, 1980.

fagocitose como a propagação de macrófagos ocorreram mais lentamente no grupo de ratos que recebeu a dieta deficiente em vitamina B<sub>12</sub>.

Alguns autores têm sugerido a ocorrência de deficiência de vitamina C em alcoolistas (LESTER; BUCCINS; BIZZOCO, 1960, p. 278-282; BONJOUR, 1979, p. 434-441). Pelo fato de ser hidrossolúvel, a vitamina C é facilmente absorvida no intestino delgado, passando, desta forma, diretamente ao sangue da circulação porta, ao fígado e para o restante do organismo. Por ser absorvida rapidamente, os distúrbios intestinais - como ocorre, por exemplo, nas doenças em que há distúrbio de absorção (como em alcoolistas) - não contribuem usualmente para uma deficiência de vitamina C; na realidade uma deficiência deste nutriente é quase inevitavelmente consequência de uma ingestão inadequada da substância (HARPER; RODWELL; MAYES, 1982, p. 168).

O ácido ascórbico tem como papel principal no organismo agir como redutor, já que uma gama de produtos oriundos de reações metabólicas, como por exemplo, espécies reativas de oxigênio (superóxidos), podem danificar as células por peroxidação de lipídios e alteração da estrutura da proteína e ácido nucléico, levando ao “stress” oxidativo. Para prevenir o dano oxidativo e permitir sobrevivência num microambiente com oxigênio, as células desenvolveram um elaborado sistema de defesa antioxidante, que inclui antioxidantes não-enzimáticos como glutathiona e ácido ascórbico e enzimáticos, como, glutathiona redutase e superóxido dismutases (VICTOR et al., 2000, p. 89). Além disso, participa também na modulação de complexa via bioquímica, que é parte essencial ao metabolismo normal de células imunes (BALL et al., 1996<sup>18</sup>, citados por VICTOR et al., 2000).

O ácido ascórbico atua em várias etapas da resposta imune especialmente na função fagocítica e na imunidade mediada por células. Diversos estudos têm demonstrado que animais previamente tratados com agentes antioxidantes conhecidos podem aumentar o sistema de defesa celular (McKECHNIE et al., 1986; SUGINO et

---

<sup>18</sup> BALL, S. S.; WEINDRUCH, R.; WALFORD, R. L. In: JOHNSON JR.; J. E. et al. (Ed.). *Free radicals, ageing and degenerative diseases*. New York: Liss, 1996. p. 427-456.

al., 1987; BERNARD, 1991<sup>19</sup>, citados por VICTOR et al., 2000). Macrófagos usam ácido ascórbico durante o processo fagocítico e um decréscimo dos níveis intracelulares deste componente interfere neste processo.

Estudos prévios mostram que níveis deficientes de antioxidantes endógenos são relatados por baixa quimiotaxia (BALL et al., 1996<sup>20</sup>, citados por VICTOR et al., 2000) e assim, uma suplementação exógena com ácido ascórbico poderia melhorar esta atividade em macrófagos (DEL RIO et al., 1998). No estudo de DALLEGRI, LANZI e PATRONE (1980), no qual foram avaliados os efeitos do ácido ascórbico sobre a locomoção de neutrófilos (*in vitro*), foi demonstrado aumento significativo na presença de altas concentrações de ácido ascórbico.

No estudo de THORNER, BARKER e MACGREGOR (1983), que pesquisou o efeito do ácido ascórbico na aderência de PMN de pacientes submetidos a transplante renal, cuja imunidade está reduzida, devido terapia imunossupressiva. Os resultados demonstraram que o grupo de pacientes transplantados que recebeu ácido ascórbico apresentou melhora em relação a função de aderência de PMN quando comparado ao grupo controle, ficando comprovado o efeito benéfico do ácido ascórbico sobre PMN.

O objetivo da pesquisa de DEL RIO et al. (1998) foi estudar o efeito de antioxidantes (vitamina E, ácido ascórbico, glutathiona, e outros), em diferentes concentrações, em vários níveis do processo fagocítico em macrófagos peritoneais de camundongos em cultura celular; avaliando, aderência ao substrato, migração e

---

<sup>19</sup> MCKECHNIE, K.; FURMAN, B. L.; PARRATT, J. R. Modification by free radical scavengers of the metabolic and cardiovascular effects of endotoxin infusion in conscious rats. *Circ. Shock*, New York. v. 19, p. 429-439, 1986; SUGINO, K.; KIYOHICO, D.; YAMADA, K.; KAWASAKI, T. The role of lipid peroxidation in endotoxin-induced hepatic damage and the protective effect of antioxidants. *Surgery*, St. Louis. v. 101, p. 746-752, 1987; BERNARD, G. R. N-acetylcysteine in experimental and clinical acute lung injury. *Am. J. Med.*, New York, v. 91, p. 54S-59S, 1991.

<sup>20</sup> BALL, S. S.; WEINDRUCH, R.; WALFORD, R. L. In: JOHNSON JR., J. E. et al. (Ed.). *Free radicals, ageing and degenerative diseases*. New York: Liss, 1996. p. 427-456.

ingestão. Os resultados mostraram que a presença de antioxidantes estimulam o processo fagocítico em macrófagos. Pois, houve elevação em relação a aderência ao substrato, após incubação breve, com ácido ascórbico e vitamina E; como também, aumento na quimiotaxia e ingestão, em relação a todos antioxidantes usados. Os autores sugerem que o aumento na função imune causada por suplementação de dieta com antioxidantes, ocorre devido uma ação direta em fagócitos. A importância da suplementação com antioxidantes reside no fato de que o nível intracelular de ácido ascórbico em fagócitos diminui significativamente frente às doenças.

O estudo de VICTOR et al. (2000), também investigou o efeito *in vitro* do ácido ascórbico em diferentes concentrações, em várias etapas do processo fagocítico. Os camundongos sofreram choque endotóxico e macrófagos peritoneais de camundongos foram expostos ao ácido ascórbico, a fim de avaliar aderência ao substrato, quimiotaxia, ingestão de partículas e produção de superóxidos. Todas as concentrações de ácido ascórbico em animais controle aumentaram significativamente o índice fagocítico. Este estudo sugere que o ácido ascórbico pode regular o processo fagocítico no choque endotóxico, principalmente reduzindo a produção de radicais livres e com isso pode reduzir a severidade do choque endotóxico.

Alcoolistas apresentam decréscimo na densidade óssea e massa óssea (GASCON-BARRÉ; JOLY, 1981), aumentando a suscetibilidade para fraturas, e osteoporose, anormalidades que podem ser atribuídas, em parte, aos níveis insuficientes de vitamina D. Esta deficiência pode resultar de uma ingestão dietética pobre, insuficiência pancreática, colestase, ou insuficiente exposição ao sol (LIEBER, 1989, p.201). Etanol e doenças hepáticas em alcoolistas interferem no metabolismo da vitamina D, conduzindo a perda de uma das formas químicas da vitamina D (vitamina D<sub>3</sub>) diminuindo esta excreção na bile (GASCON-BARRÉ; JOLY, 1981).

A vitamina D é uma pequena molécula hidrofóbica, que se difunde diretamente através da membrana plasmática das células-alvo e liga-se aos receptores protéicos intracelulares. A ligação ativa os receptores, os quais então regulam a

transcrição de genes específicos (ALBERTS et al., 1997, p. 729).

Neste estudo, será utilizada a vitamina D<sub>3</sub> ou colecalciferol, que pode exercer diversos efeitos sobre tipos celulares distintos do sistema imune, incluindo monócitos/macrófagos.

BAR-SHAVIT et al. (1981) estudaram o efeito da vitamina D<sub>3</sub> *in vitro* em relação a resposta fagocítica de macrófagos peritoneais de ratos deficientes em vitamina D<sub>3</sub> e ratos com níveis normais desta vitamina. Os resultados encontrados demonstram que em ratos com níveis normais de vitamina D<sub>3</sub> não houve alteração em relação a resposta fagocitária, porém, em ratos com deficiência de vitamina D<sub>3</sub> a resposta fagocitária apresentava-se reduzida, mas, após incubação com a vitamina D<sub>3</sub>, a resposta foi restaurada.

No estudo de XU et al. (1993) foi investigado o efeito da vitamina D<sub>3</sub> em relação a capacidade fagocítica de monócitos oriundos de sangue humano. Os monócitos foram incubados com *E. coli*, a 37°C por 10 minutos com agitação, e a avaliação da capacidade fagocítica foi realizada por citometria. Os resultados demonstraram, que o aumento na fagocitose em monócitos expostos à vitamina D<sub>3</sub>, depende de alguma forma da dose e do tempo de exposição.

Na pesquisa de HAUG et al. (1998) foi investigado o efeito da suplementação com vitamina D<sub>3</sub> *in vitro* na replicação de *Mycobacterium avium* complex (MAC) em macrófagos de pacientes infectados com HIV. Após 3 e 7 dias de infecção, a suplementação com vitamina D<sub>3</sub> aumentou o número de bactérias nos macrófagos de pacientes controle (não infectados pelo HIV). Em contraste, houve um decréscimo no número de bactérias nas células de pacientes infectados com HIV; estes resultados sugerem que a vitamina D<sub>3</sub> pode modular significativamente a resposta de macrófagos em pacientes infectados com HIV.

Portanto, esta pesquisa teve como objetivo avaliar a resposta fagocitária de macrófagos peritoneais de camundongos mantidos em condições de cultura celular, após exposição ao etanol, às vitaminas A, B<sub>12</sub>, C e D<sub>3</sub> e microelemento zinco

isoladamente, e numa segunda etapa, ao etanol e microelementos concomitantemente, através do percentual de macrófagos que fagocitaram leveduras e do índice fagocítico. E comparar os resultados obtidos com os resultados dos grupos controle.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*), suíços, albinos, machos, de dois a três meses de idade, com o peso variando entre 30 e 40 g fornecidos pelo Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

#### 3.2 MATERIAL

O meio de cultura utilizado foi DMEM (D-6655) da SIGMA (U.S.A) (apêndice 1). A escolha do meio de cultura (DMEM-SIGMA) foi baseada em SWANSON; BERTHIAUME; MEDINA (1995), cujo estudo central são macrófagos e fagocitose. Este meio foi suplementado com SFB da CULTILAB (Brasil), gentamicina e estreptomicina da GIBCO (U.S.A).

O etanol absoluto da MERCK (Alemanha) e as vitaminas foram doadas pela Farmácia de Manipulação e Ervanário o Boticário (Brasil): vitamina A hidrossolúvel, vitaminas B<sub>12</sub>, C e D<sub>3</sub>, bem como, o microelemento zinco (sulfato de zinco).

As placas de cultura de 24 poços (*wells*) utilizadas foram da marca NUNC (Dinamarca), e as lamínulas redondas de vidro da KNITTEL.

Os filtros utilizados foram descartáveis e os papéis para filtro com poro 0.22 µm (MILLEX - MILLIPORE BRASIL).

Os reagentes químicos empregados foram: acetona (MERCK, Alemanha), xileno (REAGEN, Brasil), ácido pícrico (CINÉTICA, Brasil), corante eosina-azul de metileno de acordo com técnica de Gyemsa (BEÇAK; PAULETE, 1976) (VETEC, Brasil), e glicerol (GIBCO, U.S.A).

As lâminas de vidro foram fornecidas pela empresa CORNING (México) e o enthellan pela MERCK (Alemanha).

### 3.3 OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS PERITONIAIS RESIDENTES

Os camundongos foram sacrificados por inalação com éter etílico, presos pelas patas com agulhas em posição de decúbito dorsal, a fim de que o peritônio ficasse bem estendido para facilitar a coleta de macrófagos. Foi realizada a assepsia da região abdominal com álcool 70% e o peritônio exposto com o auxílio de duas pinças dente-de-rato estéreis, permitindo melhor visualização dos órgãos internos.

Assim sendo, a coleta foi realizada, seguindo certos procedimentos que evitam a contaminação, como: evitar o contato da agulha com o intestino do animal; coletar o lavado peritoneal de uma só vez, ou seja, evitar perfurar o peritônio várias vezes para fazer a coleta, obter a maior quantidade possível de lavado límpido (amarelo), e se houver a presença de coloração alaranjada ou vermelha, desprezar o material, pois seria indicativo da presença de hemácias, que prejudicariam o cultivo e a viabilidade celular (CIPRIANO, 1994, p. 33; PIEMONTE, 1999, p. 25; D. F. BUCHI, 2000<sup>21</sup>). Em seguida, foram injetados 10 ml de PBS estéril na cavidade peritoneal do camundongo, realizada leve massagem peritoneal para ativação dos macrófagos, e posterior coleta utilizando-se seringa e agulha também estéreis. O lavado peritoneal foi colocado em recipiente estéril, mantido em contato com gelo até o plaqueamento (WEINFELD; BIRMAN; PAULA, 1999, p. 234; BUCHI, 2000<sup>22</sup>).

### 3.4 PROTOCOLO PARA HIGIENIZAÇÃO DE LAMÍNULAS DE VIDRO PARA POSTERIOR PLAQUEAMENTO

Antes de se iniciar o experimento, foi colocado 1 litro de água destilada e deionizada em um recipiente (béquer) acrescida de 250 µl de Triton ou 150 µl de Extran. A seguir foram colocadas as lamínulas de vidro, que foram mantidas sob suave agitação por 15 a 30 minutos (por rotação superficial da água com bastão de vidro).

---

<sup>21</sup> BUCHI, D. F., 2000, é uma apostila da Disciplina de Cultura Celular do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular (mestrado) da Universidade Federal do Paraná.

<sup>22</sup> Ver nota anterior.

As lamínulas foram lavadas em água destilada, 10 vezes consecutivamente, mantendo-se a agitação. Em seguida, foram colocadas em água milique por 24 horas; e posteriormente, imersas em etanol. Após serem enxutas individualmente com papel toalha, foram levadas à Placa de Petri (forrada internamente com papel filtro em ambas as partes, embrulhada em papel alumínio) e autoclavadas.

### 3.5 PLAQUEAMENTO PELO MÉTODO DA GOTA CENTRALIZADA

Toda coleta resultou de um *pool* de lavado peritoneal, ou seja, em média foram utilizados 6 camundongos, dos quais os lavados foram homogeneizados e, depois centrifugados durante 4 a 5 minutos em 1000 a 1500 rpm; para cada 10 ml de sobrenadante que após centrifugação foi desprezado, o restante do material foi ressuspenso em 2 ml de meio (DMEM). Após contagem em Câmara de Neubauer a média de macrófagos/ml foi de  $16 \times 10^5$ .

Na placa de cultura, geralmente de 24 poços (*wells*), previamente preparada com as lamínulas autoclavadas, 50  $\mu$ l do material (ressuspenso em meio de cultura DMEM) foi colocado no centro da lamínula; a placa foi então levada à estufa a 37°C, com CO<sub>2</sub> a 5% por 15 a 30 minutos. Depois deste período, em cada poço foi colocado 1 ml de DMEM estéril (pH 7,2) suplementado com 10% de SFB, 0,8 ml de gentamicina (50 mg/ml) q.s.p. 1000 ml de meio e 2,0 ml de estreptomicina (20 mg/ml) q.s.p. 1000ml de meio. Ao colocar o meio é importante que seja acrescentado delicadamente de forma a escorrer pela borda do poço. A seguir, foram levados novamente à estufa de CO<sub>2</sub> por 24 horas.

Após ser retirado o meio de cultura, cada poço foi lavado com PBS estéril, pH 7,2 a 7,4, também escorrendo delicadamente pela borda do poço. A seguir, foi colocado 1 ml de DMEM suplementado com SFB e novamente, levado à estufa de CO<sub>2</sub> por 24 horas. Com esta lavagem, outras células não aderentes, como hemácias, e mesmo macrófagos que não aderiram, foram retirados.

Todas as etapas foram acompanhadas em microscópio invertido Leica DM IL do Laboratório de Cultivo Celular, do Departamento de Biologia Celular da UFPR, para avaliar vários aspectos importantes dos macrófagos, como: adesão, espriamento, brilho e ausência de contaminação. Desta forma foi permitido definir o momento adequado para introduzir as substâncias relacionadas ao experimento no meio de cultura: etanol e micronutrientes.

### 3.6 EFEITO DO ETANOL EM MACRÓFAGOS RESIDENTES PLAQUEADOS

A indução de “alcoolismo experimental” na placa de cultura foi realizada com etanol na concentração de 66mM (BITTENCOURT, 2000, p. 27), durante 24 horas. Para que os critérios de aceitabilidade científica fossem cumpridos, também foram empregadas doses de até três vezes o valor da dosagem inicial.

Antes de adicionar o etanol ao meio de cultura com macrófagos, foi retirado 0.5 ml de meio de cada poço para que quando posteriormente fosse adicionada a levedura ao meio, fosse facilitado o contato macrófago/levedura.

Como o etanol foi diluído em água, foram realizados grupos controle onde as células foram expostas à água, utilizando o mesmo volume já empregado etanol / água. Todas as dosagens tanto de etanol como de água foram testadas em triplicata.

### 3.7 EFEITO DO ETANOL SOBRE A FAGOCITOSE DE LEVEDURA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* POR MACRÓFAGOS RESIDENTES PLAQUEADOS

Foi preparada uma solução de levedura de acordo com o seguinte protocolo: uma massa de aproximadamente 0,5 g de levedura *Saccharomyces cerevisiae* (fermento biológico), foi diluída em 10 ml de solução de PBS e centrifugada durante 6 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante foi desprezado e o material centrifugado por mais duas vezes com PBS, e finalmente ressuspenso em 10 ml de PBS (CIPRIANO, 1994, p. 31). Nas lamínulas contendo as culturas de macrófagos em meio DMEM e etanol,

foi colocado o sobrenadante da solução de levedura, na dosagem de 0,1ml por poço.

Em seguida, a placa foi colocada novamente em estufa de CO<sub>2</sub> a 5%, a 37°C por 60 minutos. Após este período de incubação, procedeu-se preparo para observação das células em microscopia óptica.

### 3.8 MICROSCOPIA ÓPTICA

Cada lamínula contendo os macrófagos foi submetida ao protocolo para fixação, coloração e montagem em lâmina de vidro:

- a) as células foram lavadas com PBS para retirada do meio e células não aderidas;
- b) fixação em Bouin por 5 minutos à temperatura ambiente;
- c) lavadas com álcool a 70% (2x) e posteriormente com água destilada;
- d) coloração: as lamínulas foram cobertas com GIEMSA, 1:10 em água destilada, durante 1 a 3 horas;<sup>23</sup>
- e) as lâminas foram limpas e etiquetadas;
- f) as lamínulas foram lavadas com água destilada (2x);
- g) desidratação: passadas pela bateria: acetona I, acetona II, mistura I, mistura II, mistura III, xilol I e xilol II - (3 a 5x seguidas - Ex. 3x na acetona I, 3x na acetona II, e assim sucessivamente);
- h) montagem: o excesso de xilol (tóxico) foi absorvido e as lamínulas foram aderidas à lâmina com 1 gota de resina;
- i) colocadas em estufa por 24 horas. (CIPRIANO, 1994, p. 35-36; PIEMONTE, 1999, p. 28; BUCHI, 2000<sup>24</sup>).<sup>25</sup>

---

<sup>23</sup> Até a coloração com GIEMSA todo protocolo foi realizado na própria placa de cultura.

<sup>24</sup> BUCHI, D. F., 2000, é uma apostila da Disciplina de Cultura Celular do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular (mestrado) da Universidade Federal do Paraná.

<sup>25</sup> Obs.: a) mistura I - 2:1 acetona / xilol; b) mistura II - 1:1 acetona / xilol; c) mistura III - 1:2 acetona / xilol.

### 3.9 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO FAGOCÍTICA EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS

Segundo BUCHI e SOUZA (1992) e VICTOR et al. (2000) a avaliação da função fagocítica em macrófagos peritoneais pode ser determinada pela percentagem de macrófagos que fagocitaram leveduras e pelo número de leveduras fagocitadas por macrófago (índice fagocítico).

Utilizando-se as seguintes fórmulas:

Fórmula I:

$$\% \text{ de macrófagos com leveduras} = \frac{\text{n.º de macrófagos que fagocitaram}}{\text{n.º total de macrófagos}}$$

Fórmula II:

$$\text{Índice Fagocítico} = \frac{\text{n.º de leveduras internalizadas}}{\text{n.º de macrófagos que fagocitaram}} \times \% \text{ de macrófagos com leveduras}$$

Nesta pesquisa a análise foi feita em microscópio óptico com o uso da lente objetiva de 40x.

### 3.10 PADRONIZAÇÃO DE VITAMINAS E MICROELEMENTO ZINCO

Após a aplicação do protocolo com etanol, foi iniciado o protocolo com vitaminas, e posteriormente etanol e vitaminas.

A solução de vitamina C foi padronizada por 0,1761g de vitamina C em 100ml de PBS (pH 7,2) estéril, com concentração final de 0,01M; e armazenada em vidro âmbar. A solução de vitamina B<sub>12</sub>, foi padronizada por 0,13554g em 10ml de

PBS estéril. A solução de vitamina A, foi padronizada por 0,2865g em 100ml de PBS estéril. A solução de vitamina D<sub>3</sub>, foi padronizada por 0,3846g em 100ml de PBS estéril. E a solução de zinco, por 0,16146g em 100ml de PBS estéril. Antes de acrescentar cada vitamina e microelemento às células cultivadas, todas foram filtradas em sistema MILLIPORE, para evitar contaminação e preservar o resultado final do experimento.

### 3.11 EFEITO DA VITAMINA C EM MACRÓFAGOS PLAQUEADOS

O plaqueamento seguiu o mesmo procedimento já descrito no item 3.5. Após 48 horas aproximadamente, antes de adicionar a vitamina C aos macrófagos, foi retirado 0.5 ml de meio de cada poço, para que quando a levedura fosse adicionada ao meio, fosse facilitado o contato macrófago/levedura.

As células foram expostas à vitamina C, durante 24 horas, nas seguintes concentrações: 0.01, 0.1 e 0.3 mM. Como a vitamina C foi diluída em PBS, foram realizados grupos controle onde as células foram expostas ao PBS, utilizando o mesmo volume já empregado vitamina C / PBS. Todas as dosagens tanto de vitamina C como de PBS foram testadas em triplicata.

Foi dada então continuidade ao protocolo anteriormente descrito: interação com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, fixação e coloração do material, e avaliação da função fagocítica.

### 3.12 EFEITO DO ETANOL E VITAMINA C EM MACRÓFAGOS PLAQUEADOS

Todo procedimento desde coleta, plaqueamento até a etapa de adição de novos componentes foi repetido como anteriormente descrito, mas nesta etapa as células foram expostas durante 24 horas, ao etanol e vitamina C concomitantemente. As concentrações de etanol foram: 66, 132, 198 e 264 mM e as concentrações de vitamina C foram ajustadas de acordo com o volume final do meio de cultura (0.5 ml)

acrescido de etanol; variando de 0.01 a 0.6 mM. Aos grupos controle foram acrescentados água e PBS nas mesmas dosagens de etanol /vitamina C.

### 3.13 EFEITO DA VITAMINA A EM MACRÓFAGOS PLAQUEADOS

O protocolo foi repetido como descrito anteriormente e as células foram expostas à vitamina A ou ácido retinóico, durante 24 horas, nas seguintes concentrações: 0.0001mM, 0.0003mM e 0.0009mM. Ocorreu uma dificuldade em relação a solubilização da vitamina A (em pó) que é uma vitamina lipossolúvel em relação ao PBS. Após várias tentativas de solubilização insatisfatórias, usou-se vitamina A hidrossolúvel fornecida pela farmácia de manipulação e ervanário “O Boticário”, diluída em PBS. Nos grupos controle as células foram expostas ao PBS.

Após incubação com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, seguiu-se o protocolo para microscopia óptica e avaliação da função fagocítica.

### 3.14 EFEITO DO ETANOL E VITAMINA A EM MACRÓFAGOS PLAQUEADOS

Todo procedimento desde coleta, plaqueamento até a etapa de adição de novos componentes foi repetido como anteriormente descrito, mas nesta etapa as células foram expostas durante 24 horas, ao etanol e vitamina A concomitantemente. As concentrações de etanol foram: 66, 132, 198 e 264 mM e as concentrações de vitamina A foram ajustadas de acordo com o volume final do meio de cultura (0.5 ml) acrescido de etanol; variando de 0.0001 a 0.002mM. Aos grupos controles foram acrescentados água e PBS nas mesmas dosagens de etanol /vitamina A.

### 3.15 EFEITO DA VITAMINA D<sub>3</sub> EM MACRÓFAGOS PLAQUEADOS

Novamente foi repetido o protocolo de coleta, plaqueamento e após 48 horas de cultura celular, as células foram expostas à vitamina D<sub>3</sub> ou colecalciferol, durante 24 horas, nas seguintes concentrações: 0.0001mM, 0.0003mM e 0.0007mM. Como a vitamina D também é uma vitamina lipossolúvel, a solubilização em PBS não foi satisfatória, assim sendo, a solubilização da vitamina D<sub>3</sub> ocorreu na farmácia de manipulação e ervanário “O Boticário”, segundo protocolo interno.

Foi utilizado o seguinte protocolo: para obter-se 5ml de solução final de vitamina D<sub>3</sub>, foram trituradas 0.019 g de vitamina D<sub>3</sub> (em pó) em 5 ml de dipropileno em graal com pistilo e adicionadas 45 gotas de éter sulfúrico, depois essa solução foi levada ao banho-maria (37° C) para que houvesse evaporação do éter sulfúrico.

Para todas as concentrações de vitamina D<sub>3</sub> foram realizados grupos controle onde as células foram expostas ao PBS. Posteriormente, todos os grupos foram incubados durante 60 minutos com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, seguindo-se o protocolo para microscopia óptica e avaliação da função fagocítica.

### 3.16 EFEITO DO ETANOL E VITAMINA D<sub>3</sub> EM MACRÓFAGOS PLAQUEADOS

Todo procedimento desde coleta, plaqueamento até a etapa de adição de novos componentes foi repetida como anteriormente descrito, mas nesta etapa as células foram expostas durante 24 horas, ao etanol e vitamina D<sub>3</sub> concomitantemente. As concentrações de etanol foram: 66, 132, 198 e 264mM e as concentrações de vitamina D<sub>3</sub> foram ajustadas de acordo com o volume final do meio de cultura (0.5ml) acrescido de etanol; variando de 0.0001 a 0.001mM. Aos grupos controle foram acrescidos água e PBS nas mesmas dosagens de etanol/vitamina D<sub>3</sub>.

### 3.17 EFEITO DA VITAMINA B<sub>12</sub> EM MACRÓFAGOS PLAQUEADOS

Após 48 horas de cultura celular, foi retirado 0.5 ml de meio de cada poço, antes de adicionar a vitamina B<sub>12</sub> aos macrófagos.

As células foram expostas à vitamina B<sub>12</sub>, durante 24 horas, nas seguintes concentrações: 0.0002mM, 0.001mM e 0.007mM. Como a vitamina B<sub>12</sub> foi diluída em PBS, foram realizados grupos controle utilizando-se PBS. Todas as dosagens de vitamina B<sub>12</sub>, como também, de PBS, foram testadas em triplicata.

Seguiu-se o protocolo já estabelecido: interação com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, fixação e coloração do material, e avaliação da função fagocítica.

### 3.18 EFEITO DO ETANOL E VITAMINA B<sub>12</sub> EM MACRÓFAGOS PLAQUEADOS

Após o plaqueamento, as células foram expostas ao etanol e vitamina B<sub>12</sub> concomitantemente, durante 24 horas. Foram utilizadas as mesmas concentrações de etanol anteriormente descritas, e as concentrações de vitamina B<sub>12</sub> foram ajustadas de acordo com o volume final do meio de cultura (0.5ml) por poço acrescido de etanol; variando de 0.0003 a 0.01mM. Aos grupos controle foram acrescidos água e PBS.

### 3.19 EFEITO DO MICROELEMENTO ZINCO EM MACRÓFAGOS PLAQUEADOS

Após 48 horas de cultura celular, foi mantido 1 ml de meio em cada poço, e as células foram expostas ao zinco, durante 24 horas, nas seguintes concentrações: 0.000001mM, 0.003mM e 0.005mM. Como o zinco também foi diluído em PBS, foram realizados grupos controle utilizando-se PBS. Todas as dosagens de zinco e PBS, foram testadas em triplicata. Seguiu-se o protocolo com posterior incubação com levedura (como foi mantido 1ml de meio por poço, a dosagem de sobrenadante da solução de levedura, foi ajustada para 0.2ml por poço), em seguida, o material foi

fixado e corado, e realizada avaliação da função fagocítica.

### 3.20 EFEITO DO ETANOL E ZINCO EM MACRÓFAGOS PLAQUEADOS

Após o plaqueamento, as células foram expostas ao etanol e zinco concomitantemente, durante 24 horas. As concentrações de etanol foram: 66 e 132mM, e as concentrações de zinco foram ajustadas de acordo com o volume final do meio de cultura (1ml) por poço, acrescido de etanol; variando de 0.000001 a 0.007mM. O volume da solução de levedura também foi ajustado para 0.2ml por poço, para posterior incubação por 60 minutos. Aos grupos controle foram acrescidos água e PBS. Em seguida, o material foi fixado e corado, e avaliada a função fagocítica.

### 3.21 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados obtidos com os experimentos foi realizada empregando o teste ANOVA, com pós-teste de Tukey: que compara todos pares de colunas. As diferenças foram consideradas estatisticamente para  $p < 0,05$ .

#### 4 RESULTADOS

Para o experimento com etanol, a contagem de cem macrófagos foi repetida de duas a quatro vezes para cada concentração de etanol e controle, pois o experimento foi realizado em triplicata. Esta contagem também foi mantida para o parâmetro de avaliação: índice fagocítico.

Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão médio (epm) para cada concentração de etanol.

TABELA 1 - Análise do percentual de macrófagos que fagocitaram leveduras *Saccharomyces cerevisiae* quando expostos ao etanol em cultura celular por 24 horas.

<b>Etanol (mM)</b>	<b>Percentual de macrófagos com leveduras ( % )</b>
0	78.6 $\pm$ 2.1
66	81.2 $\pm$ 2.1
132	72.0 $\pm$ 2.7
198	72.5 $\pm$ 2.6
264	80.8 $\pm$ 2.9

A análise estatística demonstrou que não houve diferença significativa ( $p < 0.05$ ) entre o percentual de macrófagos que fagocitaram leveduras após exposição a diferentes concentrações de etanol.

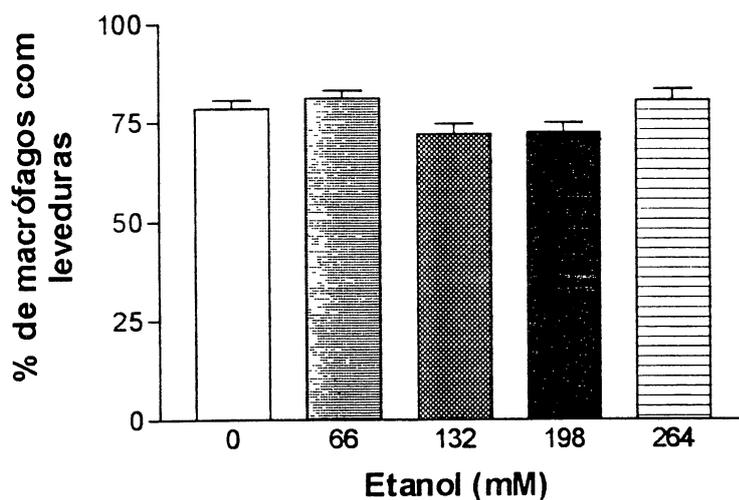


Figura 1 - Efeito do etanol em diferentes concentrações sobre macrófagos peritoneais em cultura celular durante 24 horas, que posteriormente foram incubados com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* por 60 minutos, a fim de avaliar a fagocitose. Cada coluna representa a média  $\pm$  epm do percentual de macrófagos com leveduras nas diferentes concentrações de etanol. Não houve diferença estatística significativa ( $p < 0.05$ ) entre os grupos.

A tabela 2 mostra a análise do índice fagocítico, que se referiu ao número médio de leveduras fagocitadas por macrófago. Foi utilizada a mesma contagem de macrófagos, bem como, a fórmula para obter o índice fagocítico.

Os dados também foram expressos como média  $\pm$  epm para cada concentração de etanol.

TABELA 2 – Análise do índice fagocítico em macrófagos peritoneais expostos ao etanol em cultura celular por 24 horas.

Etanol (mM)	Índice Fagocítico
0	2.35 $\pm$ 0.08
66	2.31 $\pm$ 0.13
132	1.86 $\pm$ 0.11
198	1.84 $\pm$ 0.11
264	2.42 $\pm$ 0.17

A análise estatística demonstrou que houve diferença significativa ( $p < 0.05$ ) quando comparou-se o índice fagocítico do grupo de macrófagos expostos ao etanol a 132 e 198 mM e o grupo de macrófagos expostos ao etanol a 264 mM. O índice fagocítico do grupo exposto ao etanol a 264 mM foi superior quando comparado ao índice fagocítico dos grupos expostos ao etanol nas concentrações de 132 e 198 mM.

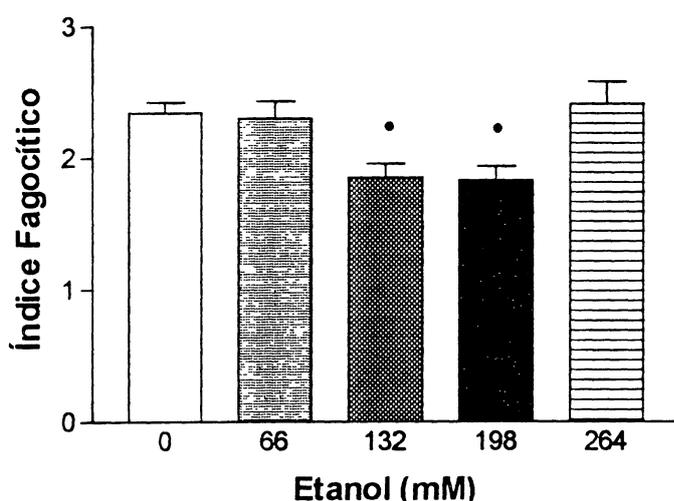


Figura 2 – Efeito do etanol em diferentes concentrações sobre macrófagos peritoneais em cultura celular durante 24 horas, que foram posteriormente incubados com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* por 60 minutos, a fim de avaliar o índice fagocítico. Cada coluna representa a média  $\pm$  epm do índice fagocítico nas diferentes concentrações de etanol. Houve diferença estatística significativa ( $p < 0.05$ ) entre os grupos marcados e o grupo de macrófagos expostos ao etanol a 264 mM.

Para cada experimento realizado com etanol, foi realizado um experimento controle com água estéril. A contagem de macrófagos e o número de leveduras fagocitadas pelos mesmos seguiram o procedimento anteriormente descrito; bem como, as fórmulas utilizadas e a análise estatística.

O objetivo de realizar experimentos controle com água, foi igualar o volume final de etanol e de água, como não seria possível utilizar mM para expressar a concentração de água, foi expressa em  $\mu$ l. Assim sendo, a concentração de etanol a

66mM correspondeu a 110  $\mu$ l de água, bem como, para concentração de etanol 132mM, correspondeu 220  $\mu$ l, para 198mM, 330  $\mu$ l de água e para a concentração de etanol 264mM, correspondeu 440  $\mu$ l de água.

Os dados obtidos em relação ao percentual de macrófagos que fagocitaram leveduras, foram expressos como média  $\pm$  epm para cada volume de água.

TABELA 3 – Análise do percentual de macrófagos que fagocitaram levedura *Saccharomyces cerevisiae* quando expostos à água (controle) em cultura celular por 24 horas.

Água ( $\mu$ l)	Percentual de macrófagos com leveduras ( % )
0	78.6 $\pm$ 2.1
110	64.3 $\pm$ 1.2
220	75.0 $\pm$ 3.0
330	67.2 $\pm$ 5.8
440	78.2 $\pm$ 3.8

A análise estatística demonstrou que não houve diferença significativa ( $p < 0.05$ ) do percentual de macrófagos que fagocitaram nos diferentes volumes de água.

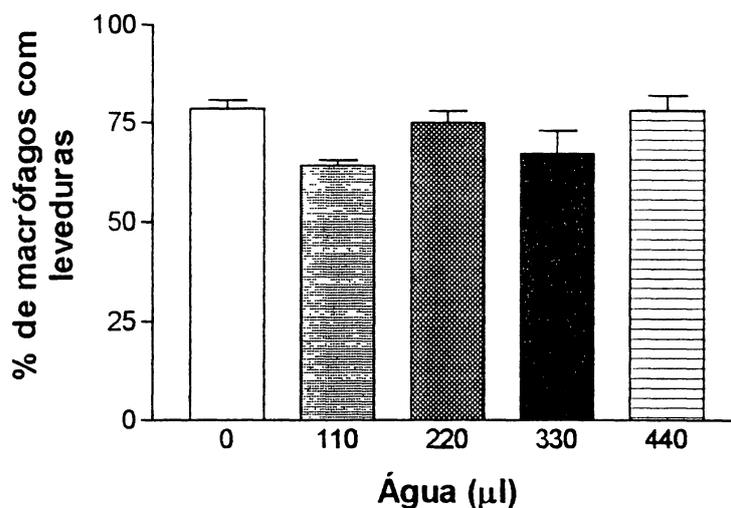


Figura 3 - Macrófagos peritoneais foram expostos à água em cultura celular por 24 horas, e posteriormente incubados com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* por 60 minutos. Cada coluna representa os diferentes volumes de água aos quais os macrófagos foram expostos, e a média  $\pm$  epm de macrófagos com leveduras, representada em percentual. Não houve diferença estatística significativa ( $p < 0.05$ ) entre os grupos.

A figura 4 mostra a análise do índice fagocítico, referindo-se ao número médio de leveduras fagocitadas por macrófago. Que foram expostos a diferentes volumes de água demonstrados na tabela abaixo.

Os dados também foram expressos como média  $\pm$  epm para cada volume de água.

TABELA 4 – Análise do índice fagocítico em macrófagos peritoneais expostos à água (controle) em cultura celular por 24 horas.

Água (µl)	Índice Fagocítico
0	2.35 $\pm$ 0.08
110	1.51 $\pm$ 0.18
220	1.90 $\pm$ 0.16
330	1.70 $\pm$ 0.22
440	2.13 $\pm$ 0.19

A análise estatística demonstrou que houve diferença significativa ( $p < 0.05$ ) quando comparou-se o índice fagocítico de macrófagos expostos à água nos volumes de 110 e 330  $\mu\text{l}$  ao grupo de macrófagos que não foram expostos à água (grupo controle).

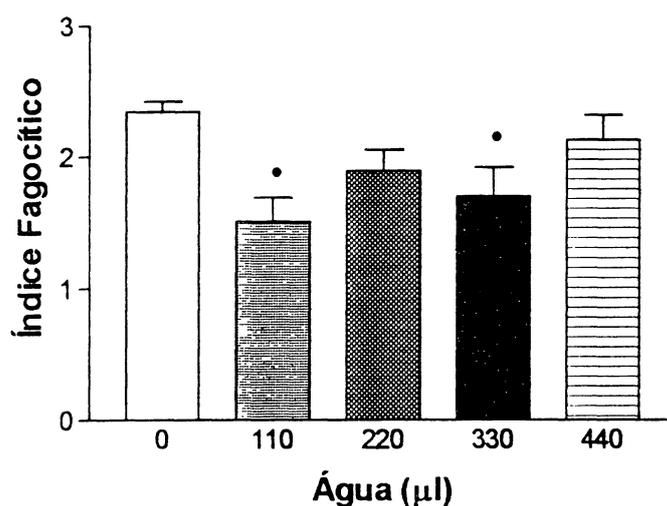


Figura 4 - Macrófagos peritoneais foram expostos à água em cultura celular por 24 horas, e posteriormente incubados com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* por 60 minutos. Cada coluna representa os diferentes volumes de água aos quais os macrófagos foram expostos, e a média  $\pm$  epm de leveduras fagocitadas por macrófago. Os grupos marcados indicaram que houve diferença estatística significativa ( $p < 0.05$ ), quando comparados ao grupo controle de macrófagos que não foram expostos à água.

A figura 5 mostra a análise comparativa entre os resultados apresentados nas figuras 1 e 3. Os dados foram expressos como média  $\pm$  epm para cada concentração de etanol e para cada volume de água.

TABELA 5 – Análise do percentual de macrófagos que fagocitaram levedura *Saccharomyces cerevisiae* quando expostos ao etanol ou à água (controle) em cultura celular por 24 horas.

Etanol (mM)	Percentual de macrófagos com leveduras (%)	
	Etanol	Água (controle)
0	78.6 ± 2.1	78.6 ± 2.1
66	81.2 ± 2.1	64.3 ± 1.2
132	72.0 ± 2.7	75.0 ± 3.0
198	72.5 ± 2.6	67.2 ± 5.8
264	80.8 ± 2.9	78.2 ± 3.8

A análise estatística mostrou que não houve diferença significativa ( $p < 0.05$ ) entre os grupos, ou seja, não houve diferença significativa em relação ao percentual de macrófagos que fagocitaram leveduras quando expostos ao etanol ou à água (controle), como também, em relação a macrófagos que não foram expostos nem ao etanol e nem à água.

Pode-se observar, portanto, que o etanol não exerceu efeito detectável sobre a resposta fagocitária.

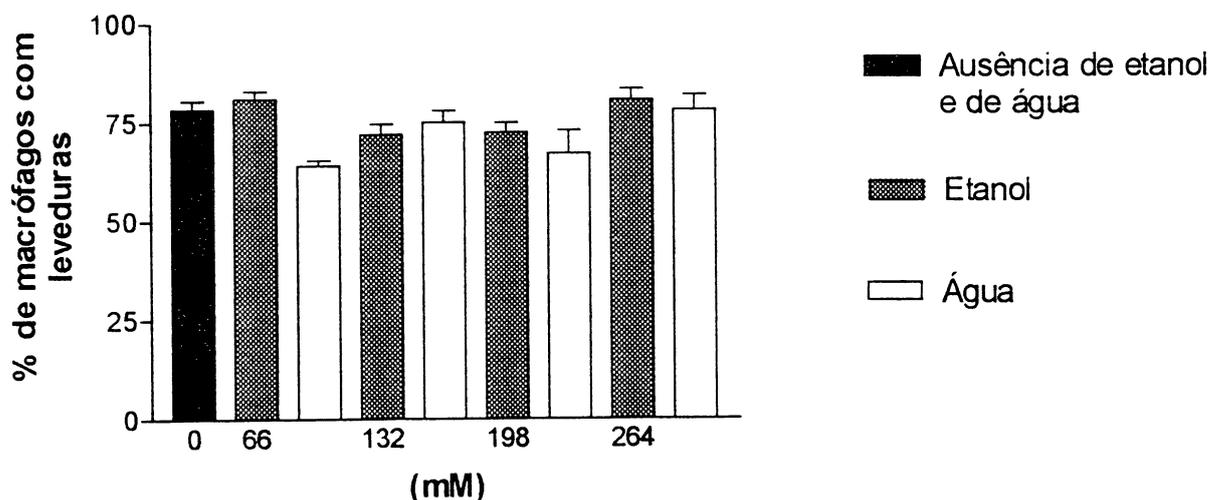


Figura 5 – Efeito do etanol ou da água (controle) durante 24 horas sobre macrófagos peritoneais em cultura celular, que foram posteriormente incubados com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* por 60 minutos, a fim de avaliar a fagocitose. Cada coluna representa a média  $\pm$  epm do percentual de macrófagos com leveduras nas diferentes concentrações de etanol ou diferentes volumes de água. Não houve diferença estatística significativa ( $p < 0.05$ ) entre os grupos.

A figura 6 mostra a análise comparativa entre os resultados apresentados na figura 2 e na figura 4. Os dados foram expressos como média  $\pm$  epm para cada concentração de etanol e para cada volume de água.

TABELA 6 – Análise do índice fagocítico em macrófagos peritoneais expostos ao etanol ou à água (controle) em cultura celular por 24 horas.

Etanol (mM)	Índice Fagocítico	
	Etanol	Água (controle)
0	2.35 $\pm$ 0.08	2.35 $\pm$ 0.08
66	2.31 $\pm$ 0.13	1.51 $\pm$ 0.18
132	1.86 $\pm$ 0.11	1.90 $\pm$ 0.16
198	1.84 $\pm$ 0.11	1.70 $\pm$ 0.22
264	2.42 $\pm$ 0.17	2.13 $\pm$ 0.19

A análise estatística demonstrou que houve diferença estatística significativa ( $p < 0.05$ ) quando comparou-se macrófagos expostos à água num volume de 110 e 330  $\mu\text{l}$  ao grupo de macrófagos que não foi exposto nem ao etanol e nem à água, sendo que o índice fagocítico dos macrófagos expostos à água foi inferior ao índice fagocítico do grupo de macrófagos com ausência de etanol e água. Como também, quando comparou-se macrófagos expostos à água nos volumes de 110 e 330  $\mu\text{l}$  a macrófagos expostos ao etanol a 264mM, foi verificado que o índice fagocítico foi inferior nos grupos expostos à água.

Em relação ao índice fagocítico, pode-se observar, que a medida que a concentração de etanol aumentou o índice fagocítico sofreu redução. Entretanto, na concentração de etanol a 264 mM houve novo aumento em relação ao índice fagocítico, formando uma curva invertida, enquanto o resultado esperado seria uma reta linear descendente. Até o presente momento não foi possível elucidar o resultado encontrado.

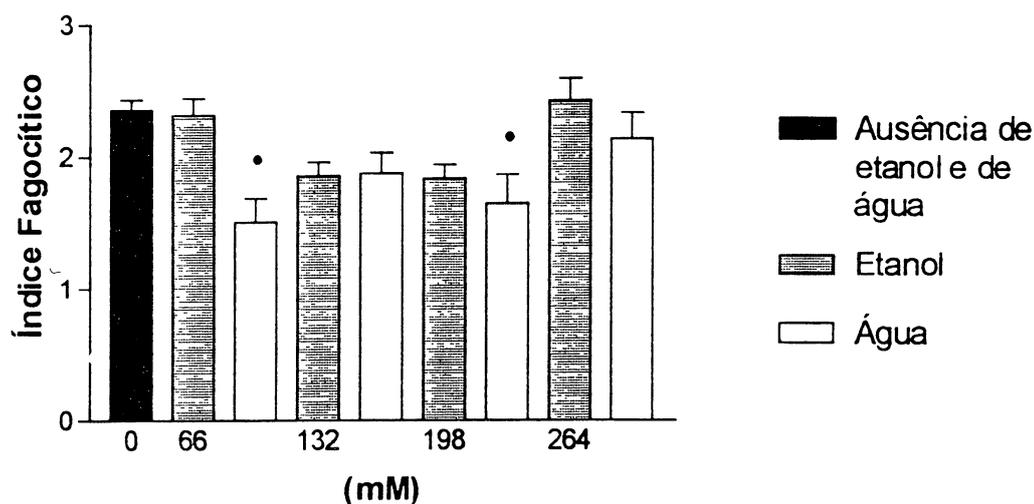


Figura 6 – Efeito do etanol ou da água (controle) durante 24 horas sobre macrófagos peritoneais em cultura celular, que foram posteriormente incubados com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* por 60 minutos, e utilizado como parâmetro de avaliação o índice fagocítico. Cada coluna representa a média  $\pm$  epm do índice fagocítico nas diferentes concentrações de etanol ou diferentes volumes de água. A análise estatística comparativa entre os grupos demonstrou que houve diferença significativa ( $p < 0.05$ ) entre os grupos marcados, ou seja, macrófagos expostos à água num volume de 110 e 330  $\mu\text{l}$  apresentaram índice fagocítico inferior ao grupo controle de macrófagos que não foram expostos nem ao etanol e nem à água, como também, a macrófagos expostos ao etanol a 264 mM.

Após a análise dos resultados com etanol, iniciou-se a análise dos resultados obtidos com a incubação dos macrófagos com os micronutrientes, e posteriormente a relação entre macrófagos, etanol e micronutrientes.

Nas figuras 7 e 8, encontram-se os resultados obtidos com o uso da vitamina C. Na figura 7, a análise refere-se ao percentual de macrófagos que fagocitaram, e os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão médio para cada concentração de vitamina C e seus respectivos controles com PBS.

TABELA 7 – Análise do percentual de macrófagos que fagocitaram levedura *Saccharomyces cerevisiae* quando expostos à vitamina C em cultura celular por 24 horas.

Vitamina C (mM)	Percentual de macrófagos com leveduras ( % )	
	Expostos à vitamina C	Expostos ao PBS (controle)
0	78.6 $\pm$ 2.1	78.6 $\pm$ 2.1
0.01	70.5 $\pm$ 0.5	67.0 $\pm$ 1.0
0.1	69.5 $\pm$ 1.5	66.5 $\pm$ 0.5
0.3	68.0 $\pm$ 4.2	62.0 $\pm$ 2.0

A análise estatística demonstrou que em relação ao percentual de macrófagos que fagocitaram leveduras houve diferença significativa ( $p < 0.05$ ) entre o grupo de macrófagos exposto ao PBS (grupo controle correspondente a concentração de vitamina C a 0.3 mM) e o grupo de macrófagos que não foi exposto nem à vitamina C e nem ao PBS.

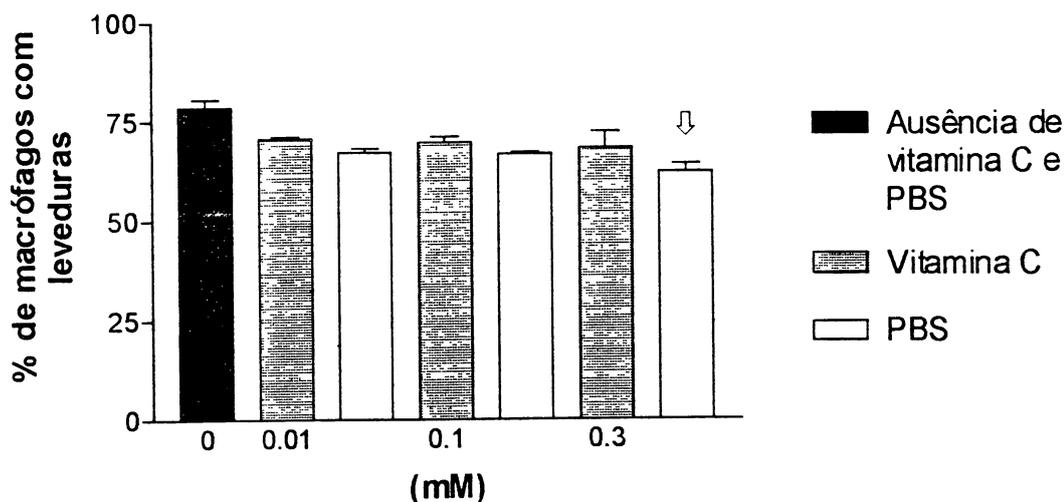


Figura 7 – Efeito da vitamina C durante 24 horas sobre macrófagos peritoneais em cultura celular, que foram posteriormente incubados com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* por 60 minutos, a fim de avaliar a fagocitose. Cada coluna representa a média  $\pm$  epm do percentual de macrófagos com leveduras nas diferentes concentrações de vitamina C e seus respectivos controles com PBS, e ainda, uma coluna representada pela ausência destes componentes. Houve diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) entre o grupo marcado e o grupo com ausência dos componentes.

A figura 8 mostra a análise do índice fagocítico e os dados também foram expressos como média  $\pm$  epm para cada concentração de vitamina C e seus respectivos controles com PBS.

TABELA 8 – Análise do índice fagocítico em macrófagos peritoneais expostos à vitamina C em cultura celular por 24 horas.

Vitamina C (mM)	Índice Fagocítico	
	Expostos à vitamina C	Expostos ao PBS (controle)
0	2.35 $\pm$ 0.08	2.35 $\pm$ 0.08
0.01	1.47 $\pm$ 0.06	1.26 $\pm$ 0.02
0.1	1.33 $\pm$ 0.09	1.45 $\pm$ 0.02
0.3	1.37 $\pm$ 0.22	1.30 $\pm$ 0.03

A análise estatística demonstrou quanto ao índice fagocítico que houve diferença significativa ( $p < 0.05$ ) entre o grupo de macrófagos que não foi exposto nem à vitamina C e nem ao PBS (grupo controle) em relação aos demais grupos.

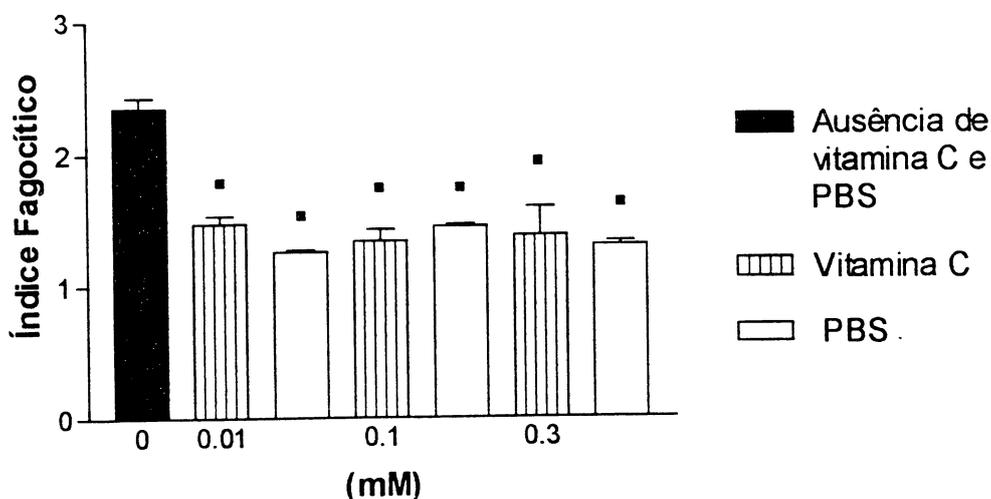


Figura 8 – Efeito da vitamina C durante 24 horas sobre macrófagos peritoneais em cultura celular, que foram posteriormente incubados com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* por 60 minutos, e utilizado como parâmetro de avaliação o índice fagocítico. Cada coluna representa a média  $\pm$  epm do índice fagocítico nas diferentes concentrações de vitamina C e seus respectivos controles com PBS, e ainda, uma coluna representada pela ausência destes componentes. Houve diferença estatística significativa ( $p < 0.05$ ) entre o grupo com ausência dos componentes e os grupos marcados.

Com isso, pode-se concluir, que a vitamina C não alterou o percentual de macrófagos que fagocitaram, mas o índice fagocítico, ou seja, o número médio de leveduras internalizadas por macrófago, sofreu significativa redução quando comparado ao controle – macrófagos em DMEM. O resultado obtido foi inverso ao esperado, pois com o acréscimo de vitamina C, não houve aumento da atividade fagocítica, portanto não foi observado efeito estimulante sobre o sistema imune.

A figura 9 mostra a comparação do percentual de macrófagos com leveduras expostos ao etanol e vitamina C ou macrófagos expostos à água e PBS, e também ao grupo de macrófagos que não foram expostos a tais compostos; os dados foram expressos como média  $\pm$  epm para cada concentração de etanol associada a cada concentração de vitamina C, e para cada controle correspondente em volume de água associado ao volume de PBS.

TABELA 9 – Análise do percentual de macrófagos que fagocitaram levedura *Saccharomyces cerevisiae* quando expostos ao etanol e vitamina C em cultura celular por 24 horas.

Etanol (mM)	Vit. C (mM)	Percentual de macrófagos com leveduras (%)	
		Expostos ao etanol e à vitamina C	Expostos à água e ao PBS
0	0	78.6 ± 2.1	78.6 ± 2.1
66	0.01	72.5 ± 1.5	74.5 ± 0.3
66	0.1	77.5 ± 2.3	68.0 ± 1.0
66	0.4	79.0 ± 2.1	74.0 ± 1.0
132	0.02	79.0 ± 2.0	74.7 ± 3.8
132	0.1	77.7 ± 2.3	77.5 ± 1.5
132	0.4	71.0 ± 2.5	82.0 ± 2.0
198	0.02	75.0 ± 1.0	71.5 ± 2.5
198	0.2	72.0 ± 6.5	76.0 ± 1.0
198	0.5	88.3 ± 1.2	68.0 ± 3.0
264	0.02	91.5 ± 3.5	86.5 ± 2.5
264	0.2	85.7 ± 5.8	79.3 ± 3.0
264	0.6	78.3 ± 5.2	72.5 ± 0.5

A análise estatística demonstrou que houve diferença significativa ( $p < 0.05$ ) entre o grupo de macrófagos exposto a concentração de etanol a 198 mM associado à vitamina C a 0.5 mM em relação ao seu controle.

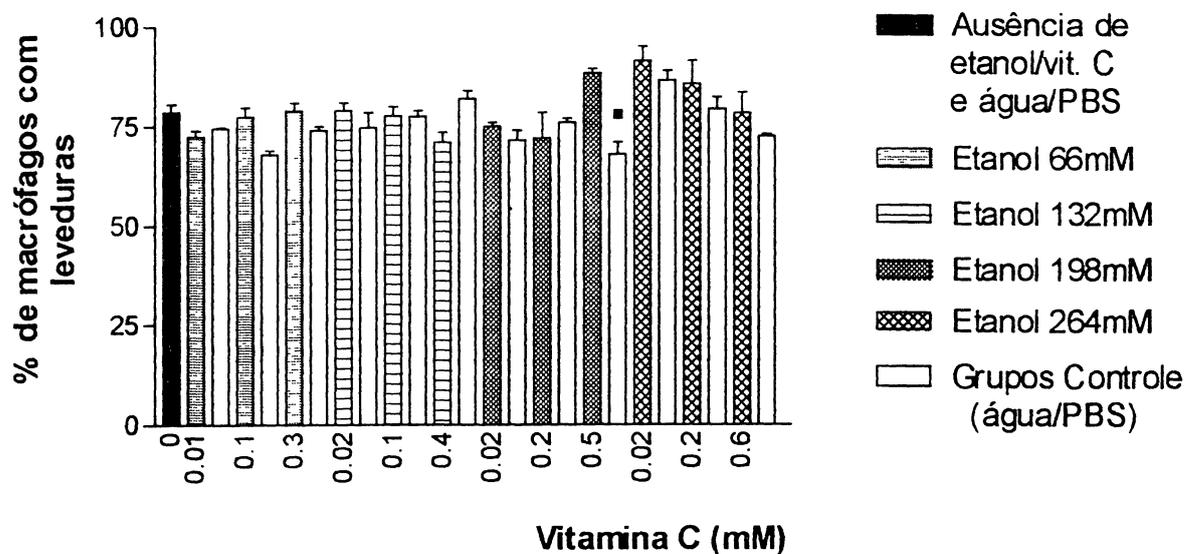


Figura 9 - Efeito do etanol associado à vitamina C durante 24 horas sobre macrófagos peritoneais em cultura celular, que foram posteriormente incubados com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* por 60 minutos, a fim de avaliar a fagocitose. Cada coluna representa a média  $\pm$  epm do percentual de macrófagos com leveduras nas diferentes concentrações de etanol associado às diferentes concentrações de vitamina C e seus respectivos controles com água e PBS, e ainda, uma coluna representada pela ausência destes compostos. Houve diferença estatística significativa ( $p < 0.05$ ) entre o grupo marcado e o grupo exposto ao etanol a 198 mM associado à vitamina C a 0.5 mM.

Na figura 10, foi comparado o índice fagocítico de macrófagos expostos ao etanol e vitamina C ou macrófagos expostos à água e PBS, e também, em relação ao grupo de macrófagos que não foram expostos a tais compostos; os dados foram expressos como média  $\pm$  epm para cada concentração de etanol associada a cada concentração de vitamina C, e para cada grupo controle correspondente.

TABELA 10 - Análise do índice fagocítico em macrófagos peritoneais expostos ao etanol e vitamina C em cultura celular por 24 horas.

Etanol (mM)	Vit. C (mM)	Percentual de macrófagos com leveduras (%)	
		Expostos ao etanol e à vitamina C	Expostos à água e ao PBS
0	0	2.3 ± 0.08	2.3 ± 0.08
66	0.01	1.4 ± 0.01	1.6 ± 0.08
66	0.1	1.9 ± 0.10	1.2 ± 0.07
66	0.4	1.7 ± 0.20	1.5 ± 0.03
132	0.02	1.7 ± 0.15	1.6 ± 0.17
132	0.1	2.0 ± 0.11	1.9 ± 0.18
132	0.4	1.5 ± 0.15	2.2 ± 0.01
198	0.02	1.7 ± 0.08	1.5 ± 0.08
198	0.2	1.7 ± 0.40	1.7 ± 0.07
198	0.5	2.6 ± 0.20	1.5 ± 0.13
264	0.02	3.5 ± 0.14	2.9 ± 0.05
264	0.2	3.0 ± 0.51	2.4 ± 0.53
264	0.6	2.05 ± 0.12	1.7 ± 0.10

A análise estatística entre estes grupos demonstrou que houve diferença significativa ( $p < 0.05$ ) entre o grupo com concentração de etanol 264 mM associado à vitamina C a 0.02 mM em relação ao grupo com a mesma concentração de etanol associado a vitamina C a 0.6 mM e seu respectivo grupo controle.

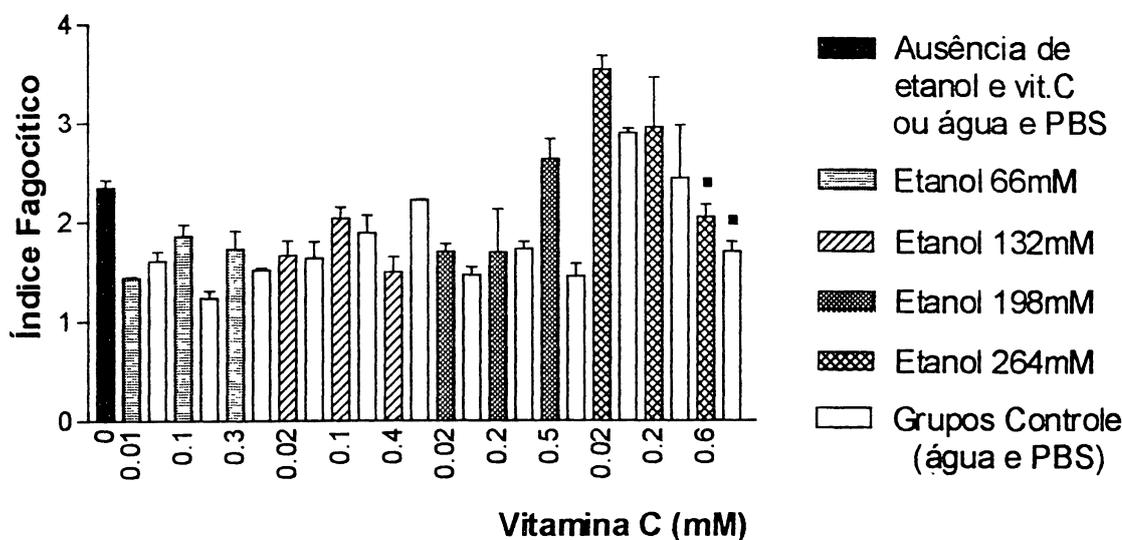


Figura 10 - Efeito do etanol associado à vitamina C durante 24 horas sobre macrófagos peritoneais em cultura celular, que foram posteriormente incubados com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* por 60 minutos. Cada coluna representa a média  $\pm$  epm do índice fagocítico nas diferentes concentrações de etanol associado às diferentes concentrações de vitamina C e seus respectivos controles com água e PBS, e ainda, uma coluna representada pela ausência destes compostos. Houve diferença estatística significativa ( $p < 0.05$ ) entre o grupo exposto ao etanol a 264 mM associado à vitamina C a 0.02 mM em relação aos grupos marcados. \* Pela análise estatística houve diferença significativa ( $p < 0.05$ ) entre outros grupos, principalmente em relação ao grupo exposto ao etanol a 264 mM associado à vitamina C a 0.02 mM, mas não foram assinalados porque não foi este o objetivo da pesquisa.

Em relação a vitamina C quando associada ao etanol os resultados obtidos foram similares aos demonstrados com a exposição à vitamina isoladamente.

Nas figuras 11 e 12, encontram-se os resultados obtidos com o uso da vitamina A ou ácido retinóico. Na figura 11, a análise refere-se ao percentual de macrófagos que fagocitaram leveduras. Os dados foram expressos como média  $\pm$  epm para cada concentração de vitamina A e seus respectivos controles com PBS.

TABELA 11 – Análise do percentual de macrófagos que fagocitaram levedura *Saccharomyces cerevisiae* quando expostos à vitamina A em cultura celular por 24 horas.

Vitamina A (mM)	Percentual de macrófagos com leveduras ( % )	
	Expostos à vitamina A	Expostos ao PBS (controle)
0	78.6 ± 2.1	78.6 ± 2.1
0.0001	85.0 ± 0.0	85.5 ± 2.5
0.0003	84.5 ± 1.5	85.5 ± 2.5
0.0009	82.0 ± 3.0	82.0 ± 2.0

A análise estatística demonstrou que não houve diferença significativa ( $p < 0.05$ ) do percentual de macrófagos que fagocitaram nas diferentes concentrações de vitamina A e seus respectivos controles com PBS.

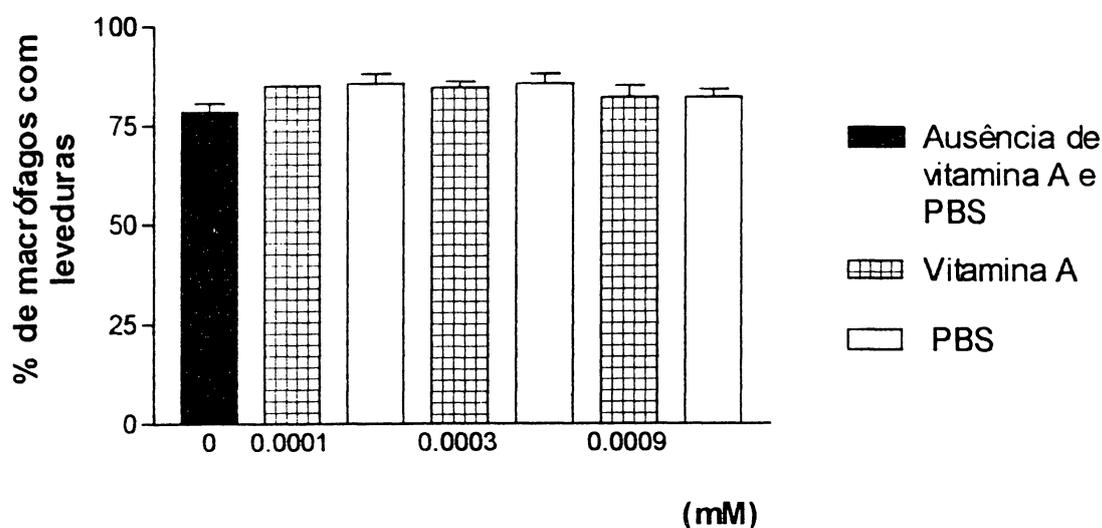


Figura 11 – Efeito da vitamina A durante 24 horas sobre macrófagos peritoneais em cultura celular, que foram posteriormente incubados com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* por 60 minutos, a fim de avaliar a fagocitose. Cada coluna representa a média ± epm do percentual de macrófagos com leveduras nas diferentes concentrações de vitamina A e seus respectivos controles com PBS, e ainda, uma coluna representada pela ausência destes componentes. Não houve diferença estatística significativa ( $p < 0.05$ ) entre os grupos.

Na figura 12 foi realizada a análise do índice fagocítico e os dados também foram expressos como média  $\pm$  epm para cada concentração de vitamina A e seus respectivos controles com PBS.

TABELA 12 – Análise do índice fagocítico em macrófagos peritoneais expostos à vitamina A em cultura celular por 24 horas.

Vitamina A (mM)	Índice Fagocítico	
	Expostos à vitamina A	Expostos ao PBS (controle)
0	2.3 $\pm$ 0.08	2.3 $\pm$ 0.08
0.0001	2.6 $\pm$ 0.41	2.4 $\pm$ 0.07
0.0003	2.4 $\pm$ 0.02	2.7 $\pm$ 0.12
0.0009	2.6 $\pm$ 0.25	2.5 $\pm$ 0.04

A análise estatística demonstrou que não houve diferença significativa ( $p < 0.05$ ) do índice fagocítico nas diferentes concentrações de vitamina A e seus respectivos controles.

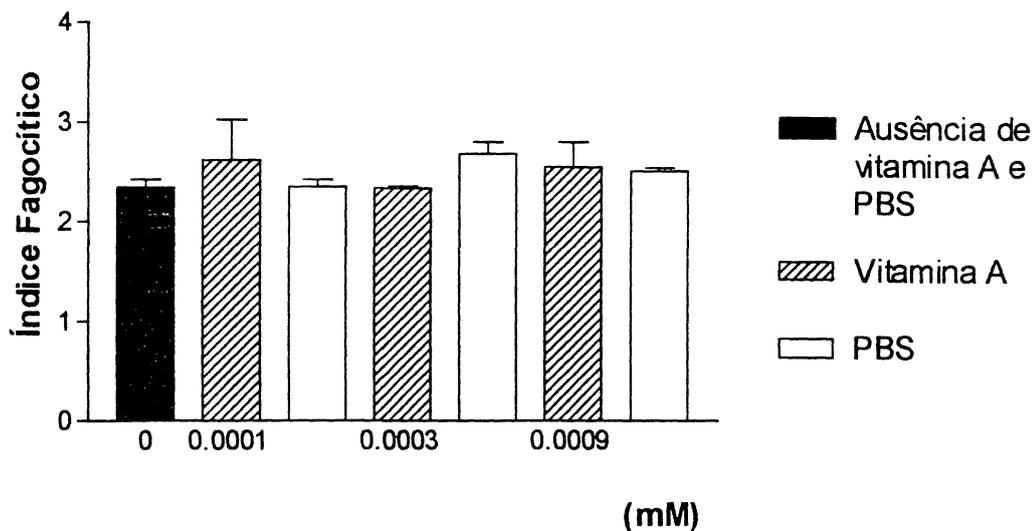


Figura 12 – Efeito da vitamina A durante 24 horas sobre macrófagos peritoneais em cultura celular, que foram posteriormente incubados com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* por 60 minutos. Cada coluna representa a média  $\pm$  epm do índice fagocítico nas diferentes concentrações de vitamina A e seus respectivos controles com PBS, e ainda, uma coluna representada pela ausência destes componentes. Não houve diferença estatística significativa ( $p < 0.05$ ) entre os grupos.

Pode-se concluir, portanto, que a vitamina A não exerceu efeito detectável na resposta fagocitária.

A figura 13 compara o percentual de macrófagos que fagocitaram leveduras quando expostos ao etanol e vitamina A ou macrófagos expostos à água e PBS, e também ao grupo de macrófagos que não foram expostos a tais compostos; os dados foram expressos como média  $\pm$  epm para cada concentração de etanol associada a cada concentração de vitamina A, e para cada controle correspondente em volume de água associado ao volume de PBS.

TABELA 13 – Análise do percentual de macrófagos que fagocitaram levedura *Saccharomyces cerevisiae* quando expostos ao etanol e vitamina A em cultura celular por 24 horas.

Etanol (mM)	Vit. A (mM)	Percentual de macrófagos com leveduras (%)	
		Expostos ao etanol e à vitamina A	Expostos à água e ao PBS
0	0	78.6 ± 2.1	78.6 ± 2.1
66	0.0001	86.5 ± 1.5	87.5 ± 1.5
66	0.0004	88.5 ± 4.5	91.5 ± 0.5
66	0.001	89.5 ± 0.5	88.0 ± 2.0
132	0.0001	90.0 ± 1.0	94.0 ± 2.0
132	0.0004	97.0 ± 1.0	94.0 ± 1.0
132	0.001	91.0 ± 1.0	97.0 ± 1.0
198	0.0002	91.5 ± 0.5	89.0 ± 2.0
198	0.0005	91.5 ± 0.5	92.0 ± 1.0
198	0.002	90.0 ± 1.0	94.0 ± 1.0
264	0.0002	91.0 ± 1.0	94.0 ± 1.0
264	0.0006	92.0 ± 1.0	93.3 ± 2.3
264	0.002	91.5 ± 2.5	94.0 ± 1.0

A análise estatística entre estes grupos demonstrou que houve diferença significativa ( $p < 0.05$ ) entre o grupo de macrófagos que não foi exposto nem ao etanol e vitamina A ou água e PBS e os grupos de macrófagos expostos ao etanol a 66 mM associado à vitamina A nas concentrações de 0.0004 e 0.001 mM. Para a concentração de etanol a 198 mM houve diferença significativa ( $p < 0.05$ ) entre o grupo de macrófagos não exposto aos compostos e o grupo controle com água e PBS, correspondente ao etanol na referida concentração associado à vitamina A a

0.0002mM. A maioria dos grupos expostos ao etanol associado a vitamina A nas diferentes concentrações ou mesmo grupos controle, apresentaram diferença estatística significativa ( $p < 0.001$ ) e ( $p < 0.01$ ) em relação ao grupo de macrófagos que não foi exposto aos compostos.

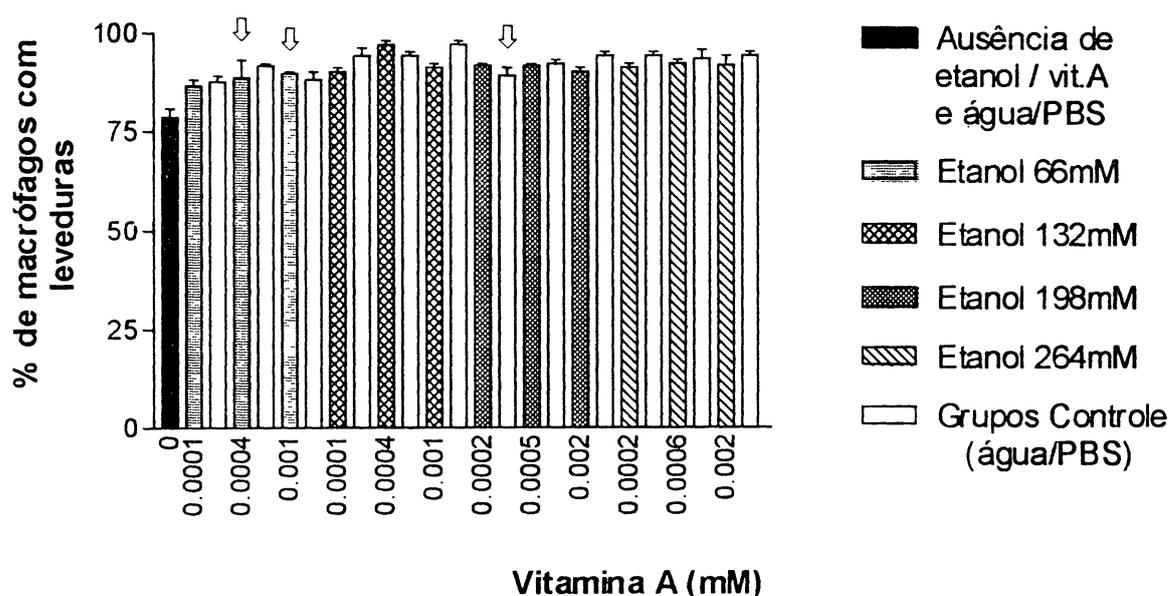


Figura 13 - Efeito do etanol associado à vitamina A durante 24 horas sobre macrófagos peritoneais em cultura celular, que foram posteriormente incubados com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* por 60 minutos, a fim de avaliar a fagocitose. Cada coluna representa a média  $\pm$  epm do percentual de macrófagos com leveduras nas diferentes concentrações de etanol associado às diferentes concentrações de vitamina A e seus respectivos controles com água e PBS, e ainda, uma coluna representada pela ausência destes compostos. Houve diferença estatística significativa ( $p < 0.05$ ) entre o grupo não exposto aos compostos e os grupos marcados. E ainda diferença estatística significativa ( $p < 0.001$ ) e ( $p < 0.01$ ) entre a maioria dos grupos expostos ao etanol associado a vitamina A nas diferentes concentrações ou mesmo grupos controle em relação ao grupo de macrófagos que não foi exposto.

Na figura 14 foi comparado o índice fagocítico de macrófagos expostos ao etanol e vitamina A ou macrófagos expostos à água e PBS, e também em relação ao grupo de macrófagos que não foi exposto a tais compostos; os dados foram expressos

como média  $\pm$  epm para cada concentração de etanol associada a cada concentração de vitamina A, e para cada controle correspondente em volume de água associado ao volume de PBS.

TABELA 14 - Análise do índice fagocítico em macrófagos peritoneais expostos ao etanol e vitamina A em cultura celular por 24 horas.

Etanol (mM)	Vit. A (mM)	Índice Fagocítico	
		Expostos ao etanol e à vitamina A	Expostos à água e ao PBS
0	0	2.3 $\pm$ 0.08	2.3 $\pm$ 0.08
66	0.0001	2.9 $\pm$ 0.13	2.6 $\pm$ 0.14
66	0.0004	3.1 $\pm$ 0.04	3.3 $\pm$ 0.13
66	0.001	2.9 $\pm$ 0.04	3.1 $\pm$ 0.14
132	0.0001	3.3 $\pm$ 0.27	3.4 $\pm$ 0.35
132	0.0004	3.6 $\pm$ 0.04	4.1 $\pm$ 0.02
132	0.001	2.8 $\pm$ 0.14	2.9 $\pm$ 0.09
198	0.0002	3.3 $\pm$ 0.08	3.0 $\pm$ 0.39
198	0.0005	2.8 $\pm$ 0.33	3.6 $\pm$ 0.46
198	0.002	2.8 $\pm$ 0.40	3.9 $\pm$ 0.10
264	0.0002	3.2 $\pm$ 0.03	3.5 $\pm$ 0.10
264	0.0006	3.3 $\pm$ 0.03	3.6 $\pm$ 0.22
264	0.002	3.2 $\pm$ 0.22	3.7 $\pm$ 0.14

Pela análise estatística houve diferença significativa ( $p < 0.05$ ) entre o grupo de macrófagos não exposto aos compostos e os grupos controle correspondentes em volume de água e PBS ao etanol a 132mM associado a vitamina A a 0.0001mM, como também, em relação ao grupo controle referente ao etanol a 264 mM associado à vitamina A a 0.0002mM.

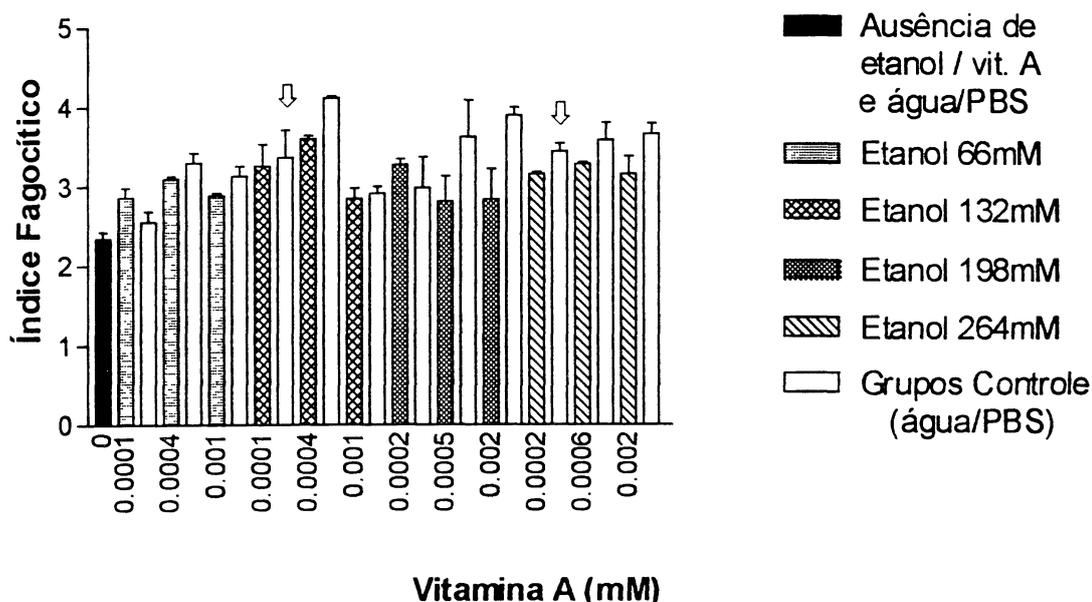


Figura 14 - Efeito do etanol associado à vitamina A durante 24 horas sobre macrófagos peritoneais em cultura celular, que foram posteriormente incubados com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* por 60 minutos. Cada coluna representa a média  $\pm$  epm do índice fagocítico nas diferentes concentrações de etanol associado às diferentes concentrações de vitamina A e seus respectivos controles com água e PBS, e ainda, uma coluna representada pela ausência destes compostos. Houve diferença estatística significativa ( $p < 0.05$ ) entre o grupo não exposto aos compostos e os grupos marcados. E ainda diferença estatística significativa ( $p < 0.001$ ) e ( $p < 0.01$ ) principalmente entre alguns dos grupos controle expostos à água e PBS em relação ao grupo de macrófagos que não foi exposto aos compostos.

Pode-se concluir em relação a vitamina A que quando esta foi associada ao etanol houve uma melhora na resposta fagocitária comparado ao grupo controle com ausência destes elementos, mas não em relação aos grupos controle com água e PBS.

Portanto, pode-se sugerir, que a vitamina A exerça um efeito superior em alcoolistas do que em indivíduos não alcoolistas.

Nas figuras 15 e 16 encontram-se os resultados obtidos com o uso de vitamina D<sub>3</sub>. Na figura 15, a análise refere-se ao percentual de macrófagos que fagocitaram, e os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão médio para cada concentração de vitamina D<sub>3</sub> e seus respectivos controles com PBS.

TABELA 15 – Análise do percentual de macrófagos que fagocitaram levedura *Saccharomyces cerevisiae* quando expostos à vitamina D<sub>3</sub> em cultura celular por 24 horas.

Vitamina D <sub>3</sub> (mM)	Percentual de macrófagos com leveduras ( % )	
	Expostos à vitamina D <sub>3</sub>	Expostos ao PBS (controle)
0	78.6 $\pm$ 2.1	78.6 $\pm$ 2.1
0.0001	92.5 $\pm$ 1.5	92.5 $\pm$ 0.5
0.0003	90.0 $\pm$ 1.0	92.0 $\pm$ 2.0
0.0007	90.0 $\pm$ 1.0	90.0 $\pm$ 1.0

A análise estatística demonstrou que houve diferença significativa ( $p < 0.05$ ) entre o grupo de macrófagos não exposto à vitamina D<sub>3</sub> e ao PBS em relação ao grupo de macrófagos exposto à vitamina D<sub>3</sub> nas concentrações de 0.0003 e 0.0007 mM, e também ao controle com PBS referente a concentração de vitamina D<sub>3</sub> a 0.0007mM. E ainda, diferença estatística significativa ( $p < 0.01$ ) entre o grupo de macrófagos não exposto e os demais grupos expostos, tanto à vitamina D<sub>3</sub> como ao PBS.

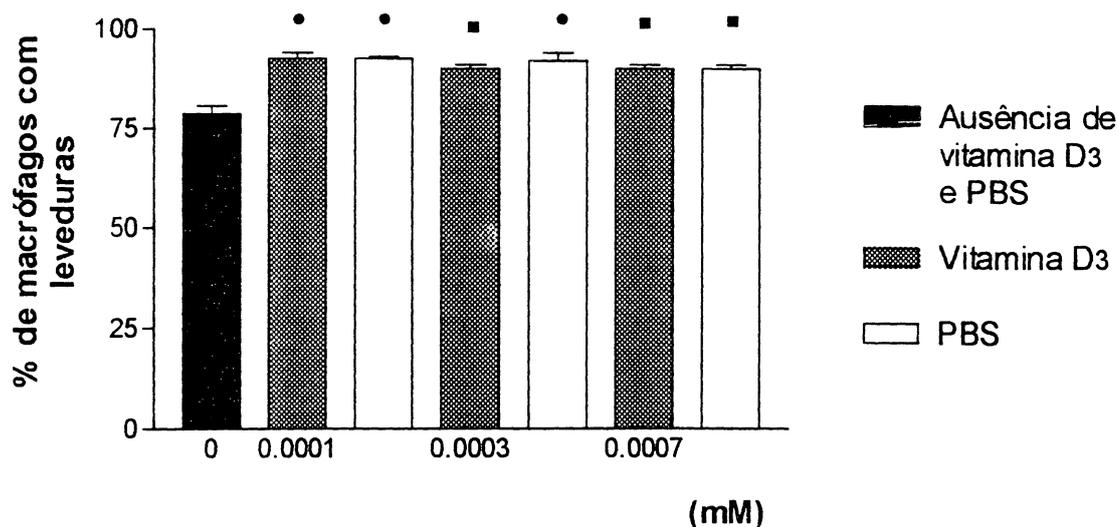


Figura 15 – Efeito da vitamina D<sub>3</sub> durante 24 horas sobre macrófagos peritoneais em cultura celular, que foram posteriormente incubados com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* por 60 minutos, a fim de avaliar a fagocitose. Cada coluna representa a média  $\pm$  epm do percentual de macrófagos com leveduras nas diferentes concentrações de vitamina D<sub>3</sub> e seus respectivos controles com PBS, e ainda, uma coluna representada pela ausência destes componentes. Houve diferença estatística significativa ( $p < 0.05$ ) entre o grupo de macrófagos não exposto e os grupos assinalados com ■, e ainda, diferença estatística significativa ( $p < 0.01$ ) entre o grupo de macrófagos não exposto à vitamina D<sub>3</sub> e ao PBS em relação aos grupos marcados com ●.

A figura 16, mostra a análise do índice fagocítico e os dados também foram expressos como média  $\pm$  epm para cada concentração de vitamina D<sub>3</sub> e seus respectivos controles com PBS.

TABELA 16 – Análise do índice fagocítico em macrófagos peritoneais expostos à vitamina D<sub>3</sub> em cultura celular por 24 horas.

Vitamina D <sub>3</sub> (mM)	Índice Fagocítico	
	Expostos à vitamina D <sub>3</sub>	Expostos ao PBS (controle)
0	2.3 $\pm$ 0.08	2.3 $\pm$ 0.08
0.0001	2.4 $\pm$ 0.09	2.8 $\pm$ 0.14
0.0003	2.2 $\pm$ 0.29	2.7 $\pm$ 0.32
0.0007	2.9 $\pm$ 0.10	2.3 $\pm$ 0.09

A análise estatística demonstrou em relação ao índice fagocítico que não houve diferença significativa ( $p < 0.05$ ) entre os grupos.

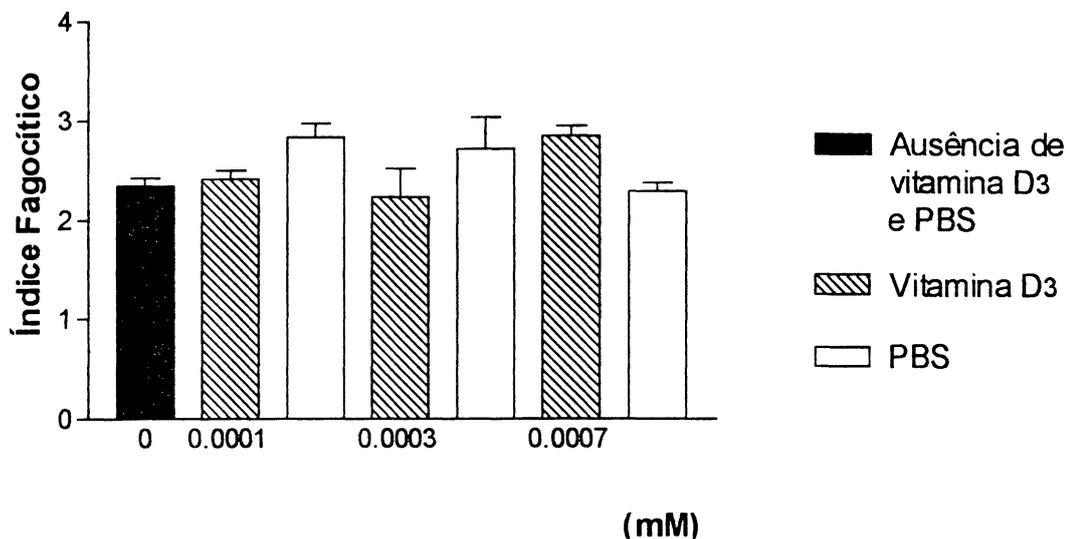


Figura 16 – Efeito da vitamina D<sub>3</sub> durante 24 horas sobre macrófagos peritoneais em cultura celular, que foram posteriormente incubados com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* por 60 minutos. Cada coluna representa a média ± epm do índice fagocítico nas diferentes concentrações de vitamina D<sub>3</sub> e seus respectivos controles com PBS, e ainda, uma coluna representada pela ausência destes componentes. Não houve diferença estatística significativa ( $p < 0.05$ ) entre os grupos.

Pode-se concluir que a vitamina D<sub>3</sub> aumentou o percentual de macrófagos com leveduras quando comparado ao grupo controle de macrófagos em DMEM, mas não houve aumento significativo em relação aos controles com PBS. Portanto, a vitamina D<sub>3</sub> não promoveu efeito considerável em relação ao índice fagocítico.

A figura 17 compara o percentual de macrófagos que fagocitaram quando expostos ao etanol e vitamina D<sub>3</sub> ou macrófagos expostos à água e PBS, e também ao grupo de macrófagos que não foram expostos a tais compostos; os dados foram expressos como média ± epm para cada concentração de etanol associada a cada concentração de vitamina D<sub>3</sub>, e para cada controle correspondente em volume de água associado ao volume de PBS.

TABELA 17 – Análise do percentual de macrófagos que fagocitaram levedura *Saccharomyces cerevisiae* quando expostos ao etanol e vitamina D<sub>3</sub> em cultura celular por 24 horas.

Etanol (mM)	Vit. D <sub>3</sub> (mM)	Percentual de macrófagos com leveduras (%)	
		Expostos ao etanol e à vitamina D <sub>3</sub>	Expostos à água e ao PBS
0	0	78.6 ± 2.1	78.6 ± 2.1
66	0.0001	93.0 ± 1.0	95.0 ± 1.0
66	0.0004	93.0 ± 4.0	94.5 ± 0.5
66	0.0009	92.7 ± 3.0	92.0 ± 2.0
132	0.0001	95.0 ± 1.0	92.5 ± 0.5
132	0.0004	91.5 ± 0.5	95.5 ± 1.5
132	0.001	91.0 ± 1.0	93.0 ± 2.0
198	0.0002	94.0 ± 1.0	92.5 ± 0.5
198	0.0005	90.0 ± 1.0	88.5 ± 0.5
198	0.001	88.7 ± 3.4	91.5 ± 0.5
264	0.0002	89.0 ± 3.0	91.5 ± 0.5
264	0.0006	86.5 ± 1.5	92.5 ± 1.5
264	0.001	90.5 ± 0.5	90.0 ± 1.0

A análise estatística demonstrou que houve diferença significativa ( $p < 0.05$ ) entre o grupo de macrófagos não exposto aos compostos em relação ao grupo de macrófagos exposto ao etanol a 132 mM associado à vitamina D<sub>3</sub> a 0.001 mM. Como também, em relação ao grupo de macrófagos exposto ao etanol a 198 mM associado às concentrações de vitamina D<sub>3</sub> a 0.0005 e 0.001 mM. E ainda, em relação ao grupo de macrófagos exposto ao etanol a 264 mM associado à vitamina D<sub>3</sub> a 0.001 mM e seu

respectivo controle com PBS. A maioria dos grupos expostos ao etanol associado a vitamina D<sub>3</sub> nas diferentes concentrações ou mesmo grupos controle, apresentaram diferença estatística significativa ( $p < 0.001$ ) e ( $p < 0.01$ ) em relação ao grupo de macrófagos que não foi exposto aos compostos.

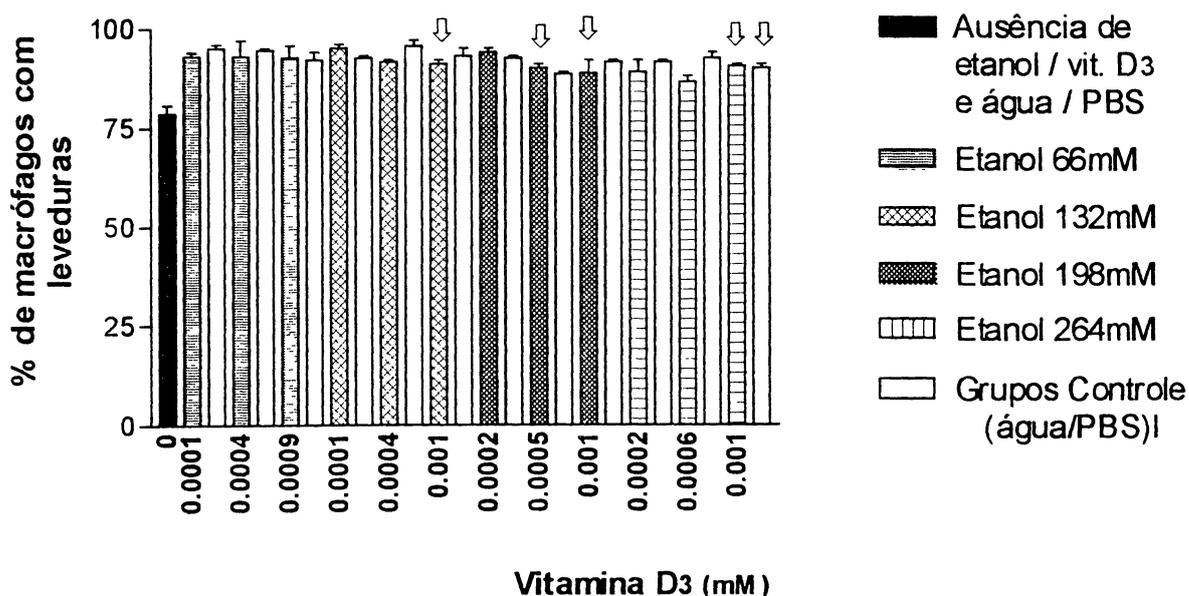


Figura 17 - Efeito do etanol associado à vitamina D<sub>3</sub> durante 24 horas sobre macrófagos peritoneais em cultura celular, que foram posteriormente incubados com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* por 60 minutos, a fim de avaliar a fagocitose. Cada coluna representa a média  $\pm$  epm do percentual de macrófagos com leveduras nas diferentes concentrações de etanol associado às diferentes concentrações de vitamina D<sub>3</sub> e seus respectivos controles com água e PBS, e ainda, uma coluna representada pela ausência destes compostos. Houve diferença estatística significativa ( $p < 0.05$ ) entre o grupo não exposto aos compostos e os grupos marcados. E ainda diferença estatística significativa ( $p < 0.001$ ) e ( $p < 0.01$ ) entre a maioria dos grupos expostos ao etanol associado a vitamina D<sub>3</sub> nas diferentes concentrações ou mesmo grupos controle em relação ao grupo de macrófagos que não foi exposto.

Na figura 18, foi comparado o índice fagocítico de macrófagos expostos ao etanol e vitamina D<sub>3</sub> ou macrófagos expostos à água e PBS, e também em relação ao grupo de macrófagos que não foram expostos a tais compostos; os dados foram expressos como média  $\pm$  epm para cada concentração de etanol associada a cada concentração de vitamina D<sub>3</sub>.

TABELA 18 – Análise do índice fagocítico em macrófagos peritoneais expostos ao etanol e vitamina D<sub>3</sub> em cultura celular por 24 horas.

Etanol (mM)	Vit. D <sub>3</sub> (mM)	Índice Fagocítico	
		Expostos ao etanol e à vitamina D <sub>3</sub>	Expostos à água e ao PBS
0	0	2.3 ± 0.08	2.3 ± 0.08
66	0.0001	3.4 ± 0.04	3.4 ± 0.14
66	0.0004	3.0 ± 0.53	3.2 ± 0.03
66	0.0009	2.9 ± 0.43	2.8 ± 0.13
132	0.0001	3.5 ± 0.11	2.9 ± 0.10
132	0.0004	3.3 ± 0.08	3.9 ± 0.40
132	0.001	2.7 ± 0.03	2.8 ± 0.16
198	0.0002	3.2 ± 0.10	3.0 ± 0.11
198	0.0005	2.3 ± 0.04	2.7 ± 0.07
198	0.001	2.5 ± 0.26	3.3 ± 0.05
264	0.0002	2.8 ± 0.04	3.3 ± 0.09
264	0.0006	2.5 ± 0.32	3.2 ± 0.21
264	0.001	2.6 ± 0.05	2.7 ± 0.27

A análise estatística demonstrou que houve diferença significativa ( $p < 0.05$ ) entre o grupo de macrófagos não exposto aos compostos em relação ao grupo de macrófagos exposto ao etanol a 132 mM associado à vitamina D<sub>3</sub> a 0.0001 mM.

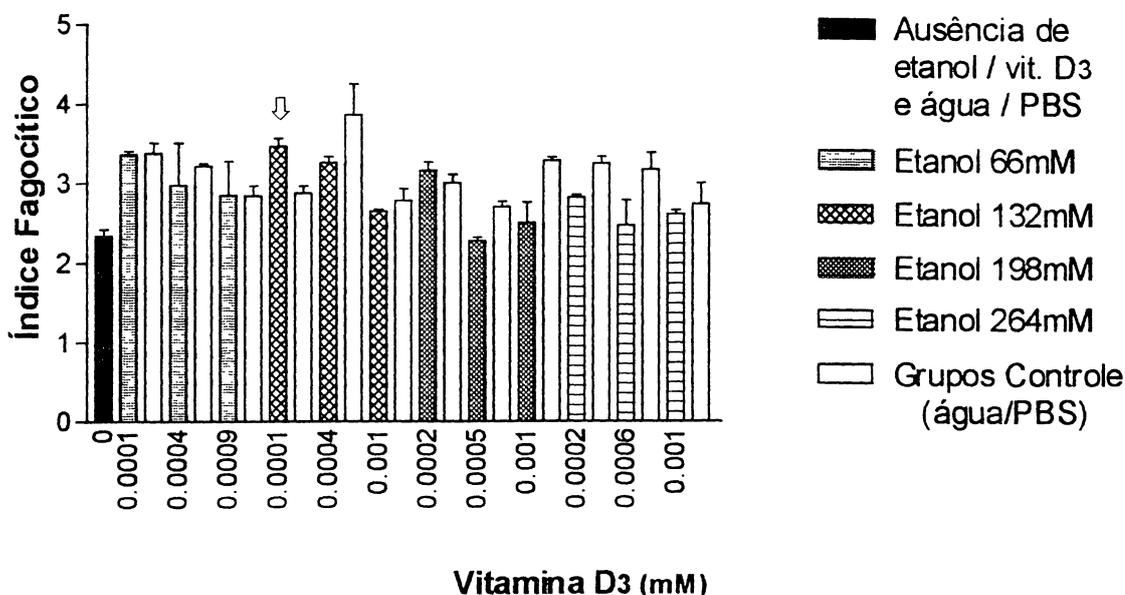


Figura 18 - Efeito do etanol associado à vitamina D<sub>3</sub> durante 24 horas sobre macrófagos peritoneais em cultura celular, que foram posteriormente incubados com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* por 60 minutos. Cada coluna representa a média  $\pm$  cpm do índice fagocítico nas diferentes concentrações de etanol associado às diferentes concentrações de vitamina D<sub>3</sub>, e seus respectivos controles com água e PBS, e ainda, uma coluna representada pela ausência destes compostos. Houve diferença estatística significativa ( $p < 0.05$ ) entre o grupo não exposto aos compostos e o grupo exposto ao etanol 132 mM associado a vitamina D<sub>3</sub> a 0.0001mM.

Em relação à vitamina D<sub>3</sub> quando associada ao etanol os resultados foram semelhantes aos demonstrados com a exposição à vitamina isoladamente.

Nas figuras 19 e 20, encontram-se os resultados obtidos com o uso da vitamina B<sub>12</sub>. Na figura 19, a análise refere-se ao percentual de macrófagos que fagocitaram leveduras, e os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão médio para cada concentração de vitamina B<sub>12</sub> e seus respectivos controles com PBS.

TABELA 19 – Análise do percentual de macrófagos que fagocitaram levedura *Saccharomyces cerevisiae* quando expostos à vitamina B<sub>12</sub> em cultura celular por 24 horas.

Vitamina B <sub>12</sub> (mM)	Percentual de macrófagos com leveduras ( % )	
	Expostos à vitamina B <sub>12</sub>	Expostos ao PBS (controle)
0	78.6 ± 2.1	78.6 ± 2.1
0.0002	62.0 ± 4.0	51.5 ± 4.5
0.001	56.0 ± 2.0	55.3 ± 3.8
0.007	53.0 ± 1.0	53.0 ± 1.0

A análise estatística demonstrou que houve diferença significativa ( $p < 0.05$ ) entre o grupo de macrófagos não exposto à vitamina B<sub>12</sub> ou ao PBS em relação ao grupo de macrófagos exposto à vitamina B<sub>12</sub> a 0.0002 mM. E os demais grupos expostos ao etanol associado a vitamina B<sub>12</sub> nas diferentes concentrações ou mesmo grupos controle, apresentaram diferença estatística significativa ( $p < 0.001$ ) e ( $p < 0.01$ ) em relação ao grupo de macrófagos que não foi exposto aos compostos.

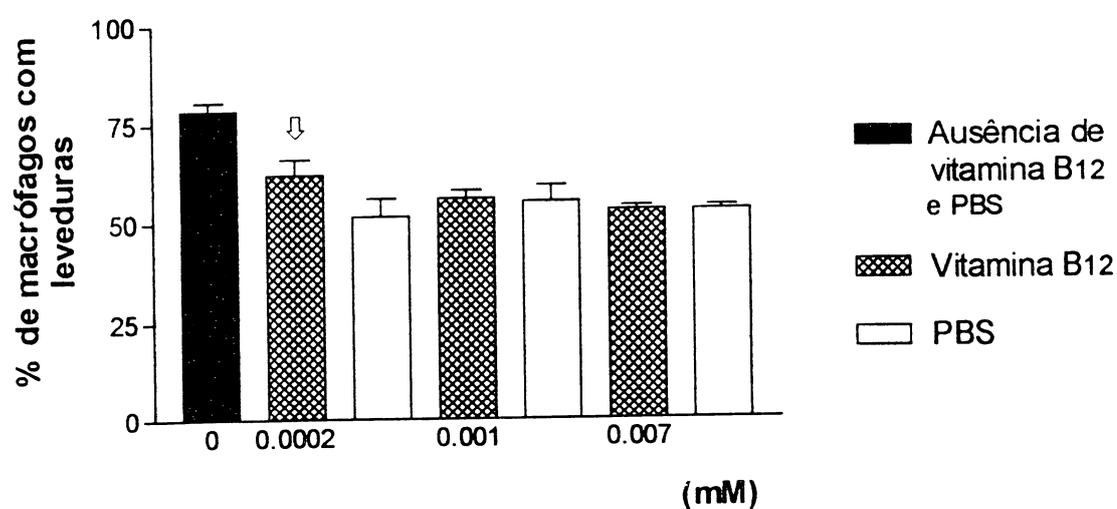


Figura 19 – Efeito da vitamina B<sub>12</sub> durante 24 horas sobre macrófagos peritoneais em cultura celular, que foram posteriormente incubados com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* por 60 minutos, a fim de avaliar a fagocitose. Cada coluna representa a média ± epm do percentual de macrófagos com leveduras nas diferentes concentrações de vitamina B<sub>12</sub> e seus respectivos controles com PBS, e ainda, uma coluna representada pela ausência destes componentes. Houve diferença estatística significativa ( $p < 0.05$ ) entre o grupo não exposto e o grupo marcado.

Na figura 20, foi feita a análise do índice fagocítico e os dados também foram expressos como média  $\pm$  epm para cada concentração de vitamina B<sub>12</sub> e seus respectivos controles com PBS.

TABELA 20 – Análise do índice fagocítico em macrófagos peritoneais expostos à vitamina B<sub>12</sub> em cultura celular por 24 horas.

Vitamina B <sub>12</sub> (mM)	Índice Fagocítico	
	Expostos à vitamina B <sub>12</sub>	Expostos ao PBS (controle)
0	2.3 $\pm$ 0.08	2.3 $\pm$ 0.08
0.0002	1.2 $\pm$ 0.03	1.0 $\pm$ 0.23
0.001	1.1 $\pm$ 0.08	1.1 $\pm$ 0.08
0.007	1.1 $\pm$ 0.04	1.1 $\pm$ 0.11

A análise estatística demonstrou que houve diferença significativa ( $p < 0.001$ ) entre o grupo de macrófagos com ausência de vitamina B<sub>12</sub> e PBS (grupo não exposto) em relação aos demais grupos, ou seja, aos grupos de macrófagos expostos às três diferentes concentrações de vitamina, como também, em relação aos grupos expostos às três dosagens diferentes de PBS.

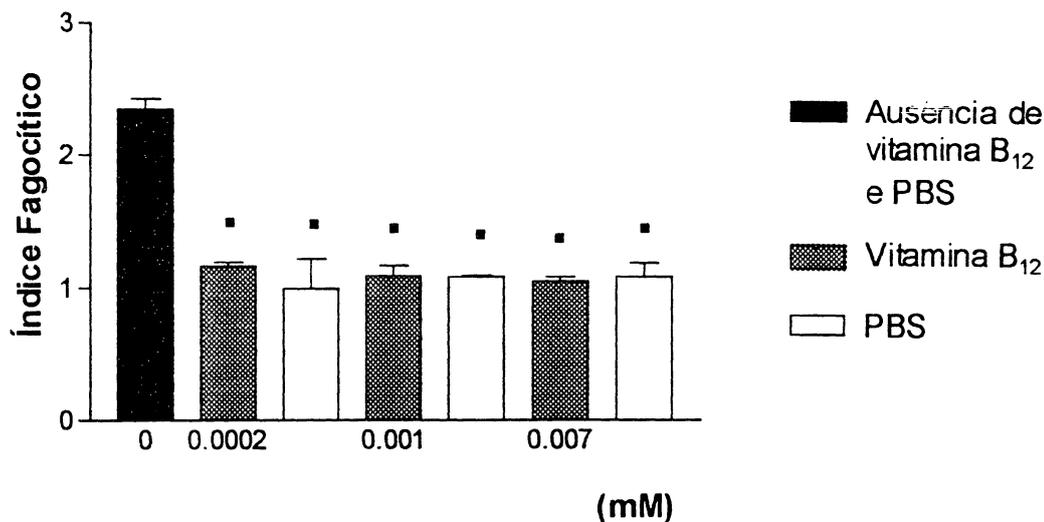


Figura 20 – Efeito da vitamina B<sub>12</sub> durante 24 horas sobre macrófagos peritoneais em cultura celular, que foram posteriormente incubados com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* por 60 minutos. Cada coluna representa a média  $\pm$  epm do índice fagocítico nas diferentes concentrações de vitamina B<sub>12</sub> e seus respectivos controles com PBS, e ainda, uma coluna representada pela ausência destes componentes. Houve diferença estatística significativa ( $p < 0.001$ ) entre o grupo de macrófagos não exposto em relação aos demais grupos.

Portanto, a vitamina B<sub>12</sub> não exerceu efeito importante sobre a resposta fagocitária. Quando comparada ao grupo controle de macrófagos em DMEM, a resposta fagocitária dos grupos expostos mostrou-se reduzida.

A figura 21 compara o percentual de macrófagos que fagocitaram leveduras quando expostos ao etanol e vitamina B<sub>12</sub> com macrófagos expostos à água e PBS, e também ao grupo de macrófagos que não foram expostos a tais compostos; os dados foram expressos como média  $\pm$  epm para cada concentração de etanol associada a cada concentração de vitamina B<sub>12</sub>, e para cada controle correspondente em volume de água associado ao volume de PBS.

TABELA 21 – Análise do percentual de macrófagos que fagocitaram levedura *Saccharomyces cerevisiae* quando expostos ao etanol e vitamina B<sub>12</sub> em cultura celular por 24 horas.

Etanol (mM)	Vit. B <sub>12</sub> (mM)	Percentual de macrófagos com leveduras (%)	
		Expostos ao etanol e à vitamina B <sub>12</sub>	Expostos à água e ao PBS
0	0	78.6 ± 2.1	78.6 ± 2.1
66	0.0003	66.3 ± 3.5	66.0 ± 2.0
66	0.001	68.5 ± 0.5	67.5 ± 2.5
66	0.009	64.3 ± 1.9	66.0 ± 2.0
132	0.0003	55.5 ± 0.5	68.5 ± 3.5
132	0.001	56.0 ± 4.0	55.0 ± 1.0
132	0.01	60.5 ± 6.5	65.0 ± 1.0
198	0.0003	57.0 ± 1.0	55.5 ± 0.5
198	0.002	64.5 ± 1.5	66.0 ± 2.0
198	0.01	68.0 ± 4.0	67.0 ± 1.0
264	0.0004	61.7 ± 5.4	60.0 ± 3.6
264	0.002	60.5 ± 1.5	58.0 ± 1.0
264	0.01	66.0 ± 2.0	68.0 ± 2.0

A análise estatística demonstrou que houve diferença significativa ( $p < 0.05$ ) entre o grupo de macrófagos não exposto à vitamina B<sub>12</sub> ou ao PBS em relação ao grupo de macrófagos exposto ao etanol a 66 mM associado a vitamina B<sub>12</sub> a 0.009 mM. E alguns grupos expostos ao etanol associado a vitamina B<sub>12</sub> nas diferentes concentrações ou mesmo grupos controle, apresentaram diferença estatística

significativa ( $p < 0.001$ ) e ( $p < 0.01$ ) em relação ao grupo de macrófagos que não foi exposto aos compostos.



Figura 21 - Efeito do etanol associado à vitamina B<sub>12</sub> durante 24 horas sobre macrófagos peritoneais em cultura celular, que foram posteriormente incubados com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* por 60 minutos, a fim de avaliar a fagocitose. Cada coluna representa a média  $\pm$  epm do percentual de macrófagos com leveduras nas diferentes concentrações de etanol associado às diferentes concentrações de vitamina B<sub>12</sub> e seus respectivos controles com água e PBS, e ainda, uma coluna representada pela ausência destes compostos. Houve diferença estatística significativa ( $p < 0.05$ ) entre o grupo não exposto aos compostos e o grupo marcado. E ainda diferença estatística significativa ( $p < 0.001$ ) e ( $p < 0.01$ ) entre alguns grupos expostos ao etanol associado a vitamina B<sub>12</sub> nas diferentes concentrações ou mesmo grupos controle em relação ao grupo de macrófagos que não foi exposto.

Na figura 22, foi comparado o índice fagocítico de macrófagos expostos ao etanol e vitamina B<sub>12</sub> ou macrófagos expostos à água e PBS, e também em relação ao grupo de macrófagos que não foram expostos a tais compostos; os dados foram expressos como média  $\pm$  epm para cada concentração de etanol associada a cada concentração de vitamina B<sub>12</sub>, e para cada controle correspondente em volume de água associado ao volume de PBS.

TABELA 22 – Análise do índice fagocítico em macrófagos peritoneais expostos ao etanol e vitamina B<sub>12</sub> em cultura celular por 24 horas.

Etanol (mM)	Vit. B <sub>12</sub> (mM)	Índice Fagocítico	
		Expostos ao etanol e à vitamina B <sub>12</sub>	Expostos à água e ao PBS
0	0	2.3 ± 0.08	2.3 ± 0.08
66	0.0003	1.0 ± 0.08	1.1 ± 0.08
66	0.001	1.2 ± 0.05	1.2 ± 0.02
66	0.009	1.1 ± 0.06	1.2 ± 0.25
132	0.0003	0.9 ± 0.04	1.3 ± 0.18
132	0.001	0.8 ± 0.13	0.8 ± 0.01
132	0.01	1.0 ± 0.06	1.0 ± 0.02
198	0.0003	0.9 ± 0.06	0.8 ± 0.03
198	0.002	1.1 ± 0.03	1.1 ± 0.10
198	0.01	1.2 ± 0.20	1.3 ± 0.01
264	0.0004	1.0 ± 0.17	1.1 ± 0.11
264	0.002	1.0 ± 0.03	1.0 ± 0.01
264	0.01	1.1 ± 0.12	1.3 ± 0.08

A análise estatística entre estes grupos mostrou diferença significativa ( $p < 0.001$ ) de macrófagos não expostos ao etanol e vitamina B<sub>12</sub> ou água e PBS em relação aos demais grupos de macrófagos. Obs.: Como a diferença foi em relação a todas as colunas da figura, as mesmas não foram assinaladas.

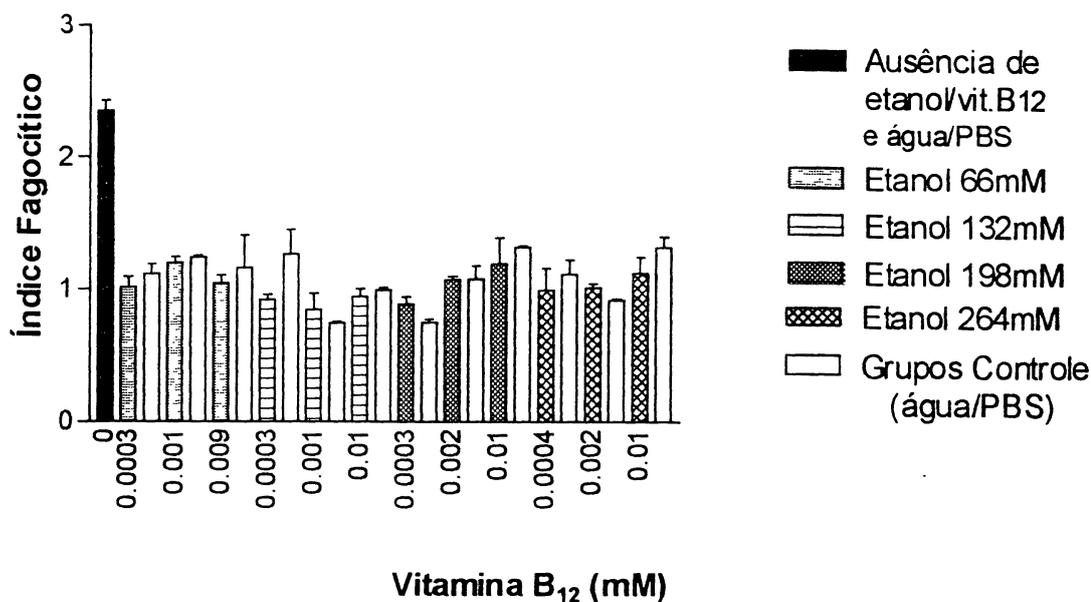


Figura 22 - Efeito do etanol associado à vitamina B<sub>12</sub> durante 24 horas sobre macrófagos peritoneais em cultura celular, que foram posteriormente incubados com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* por 60 minutos. Cada coluna representa a média ± epm do índice fagocítico nas diferentes concentrações de etanol associado às diferentes concentrações de vitamina B<sub>12</sub> e seus respectivos controles com água e PBS, e ainda, uma coluna representada pela ausência destes compostos. Houve diferença estatística significativa ( $p < 0.001$ ) entre o grupo de macrófagos não exposto aos compostos em relação aos demais grupos de macrófagos. Como a diferença foi em relação a todas as colunas da figura, as mesmas não foram assinaladas.

Em relação à vitamina B<sub>12</sub> quando associada ao etanol os resultados foram similares aos demonstrados com a exposição à vitamina B<sub>12</sub> isoladamente.

Nas figuras 23 e 24, encontram-se os resultados obtidos com o uso do microelemento zinco (sulfato de zinco). Na figura 23, a análise refere-se ao percentual de macrófagos que fagocitaram, e os dados foram expressos como média ± erro padrão médio (epm) para cada concentração de zinco e seus respectivos controles com PBS.

TABELA 23 – Análise do percentual de macrófagos que fagocitaram levedura *Saccharomyces cerevisiae* quando expostos ao microelemento zinco em cultura celular por 24 horas.

Zinco (mM)	Percentual de macrófagos com leveduras ( % )	
	Expostos ao zinco	Expostos ao PBS (controle)
0	78.6 ± 2.1	78.6 ± 2.1
0.000001	83.0 ± 1.0	72.3 ± 4.3
0.003	64.5 ± 1.5	59.5 ± 0.5
0.005	63.7 ± 4.3	63.0 ± 1.0

A análise estatística demonstrou que houve diferença significativa ( $p < 0.05$ ) entre o grupo de macrófagos não exposto ao zinco ou ao PBS em relação ao grupo de macrófagos exposto ao zinco a 0.003 e 0.005mM e seus respectivos grupos controle. Pode-se observar também, por meio da análise estatística, que o grupo de macrófagos exposto ao zinco a 0.000001mM apresentou diferença significativa ( $p < 0.05$ ) em relação aos mesmos grupos acima citados, ou seja, grupo de macrófagos expostos ao zinco a 0.003mM e 0.005 mM e seus respectivos grupos controle.

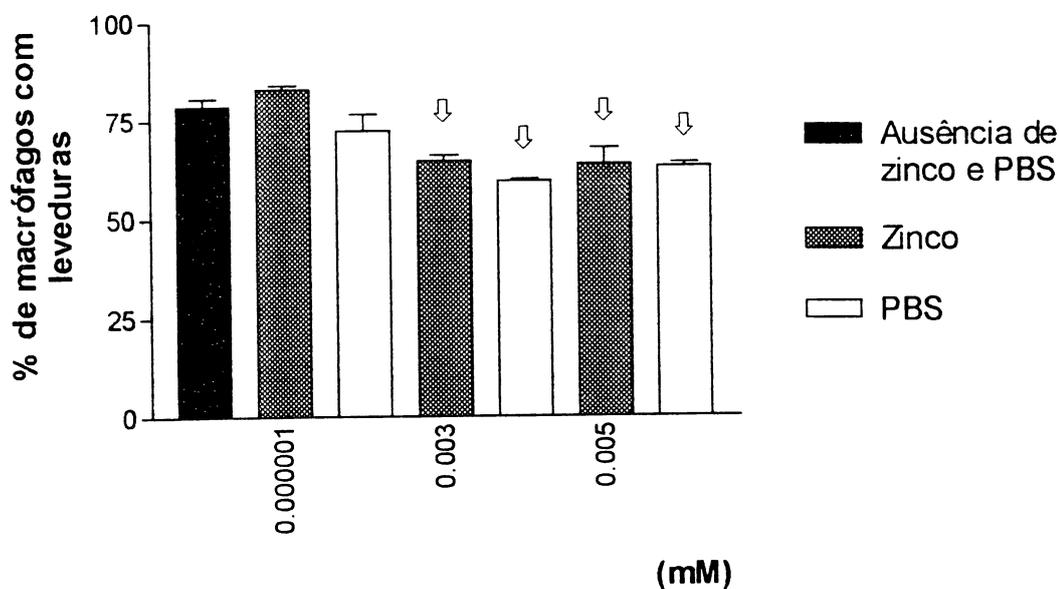


Figura 23 – Efeito do microelemento zinco durante 24 horas sobre macrófagos peritoneais em cultura celular, que foram posteriormente incubados com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* por 60 minutos, a fim de avaliar a fagocitose. Cada coluna representa a média  $\pm$  epm do percentual de macrófagos com leveduras nas diferentes concentrações de zinco e seus respectivos controles com PBS, e ainda, uma coluna representada pela ausência destes componentes. Houve diferença estatística significativa ( $p < 0.05$ ) entre o grupo de macrófagos não exposto em relação aos grupos assinalados, como também, diferença estatística significativa ( $p < 0.05$ ) do grupo de macrófagos exposto ao zinco numa concentração de 0.000001 mM em relação aos grupos assinalados.

A figura 24, mostra a análise do índice fagocítico e os dados também foram expressos como média  $\pm$  epm para cada concentração de zinco e seus respectivos controles com PBS.

TABELA 24 – Análise do índice fagocítico em macrófagos peritoneais expostos ao microelemento zinco em cultura celular por 24 horas.

Zinco (mM)	Percentual de macrófagos com leveduras ( % )	
	Expostos ao zinco	Expostos ao PBS (controle)
0	2.3 ± 0.08	2.3 ± 0.08
0.000001	2.2 ± 0.04	1.8 ± 0.12
0.003	1.5 ± 0.12	1.5 ± 0.12
0.005	1.6 ± 0.15	1.5 ± 0.04

A análise estatística demonstrou que houve diferença significativa ( $p < 0.01$ ) entre o grupo de macrófagos não exposto ao zinco ou ao PBS em relação ao grupo de macrófagos exposto ao zinco a 0.003 e 0.005mM e seus respectivos grupos controle. E ainda, diferença estatística significativa ( $p < 0.05$ ), do grupo não exposto em relação ao grupo controle do zinco a 0.000001 mM. Pode-se observar também, por meio da análise estatística, que o grupo de macrófagos exposto ao zinco a 0.000001mM apresentou diferença significativa ( $p < 0.05$ ) em relação aos mesmos grupos acima citados, ou seja, grupo de macrófagos expostos ao zinco a 0.003mM e 0.005 mM e seus respectivos grupos controle.

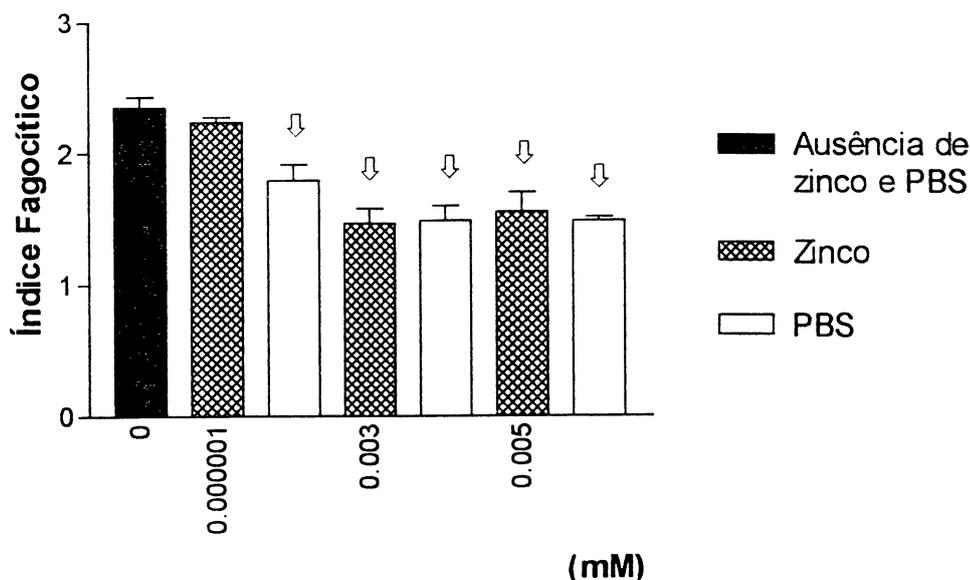


Figura 24 – Efeito do microclemento zinco durante 24 horas sobre macrófagos peritoneais em cultura celular, que foram posteriormente incubados com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* por 60 minutos. Cada coluna representa a média  $\pm$  epm do índice fagocítico nas diferentes concentrações de zinco e seus respectivos controles com PBS, e ainda, uma coluna representada pela ausência destes componentes. Houve diferença estatística significativa ( $p < 0.01$ ) entre o grupo de macrófagos não exposto em relação ao grupo de macrófagos exposto ao zinco a 0.003 e 0.005 mM e seus respectivos grupos controle, e ainda, diferença estatística significativa ( $p < 0.05$ ) em relação ao grupo controle do zinco a 0.000001 mM. Houve também diferença estatística significativa ( $p < 0.05$ ) entre o grupo de macrófagos exposto ao zinco na concentração de 0.000001 mM em relação aos grupos de macrófagos expostos ao zinco a 0.003 e 0.005 mM e seus respectivos grupos controle.

Pode-se concluir, que o zinco melhorou a resposta fagocitária na concentração mínima de 0.000001mM, a medida que houve aumento na concentração de zinco, houve redução da resposta fagocitária.

A figura 25, mostra a comparação do percentual de macrófagos que fagocitaram quando expostos ao etanol e zinco ou macrófagos expostos à água e PBS, e também ao grupo de macrófagos que não foram expostos a tais compostos; os dados foram expressos como média  $\pm$  epm para cada concentração de etanol associada a cada concentração de zinco, e para cada controle correspondente em volume de água associado ao volume de PBS.

TABELA 25 – Análise do percentual de macrófagos que fagocitaram levedura *Saccharomyces cerevisiae* quando expostos ao etanol e ao zinco em cultura celular por 24 horas.

Etanol (mM)	Zinco (mM)	Percentual de macrófagos com leveduras (%)	
		Expostos ao etanol e ao zinco	Expostos à água e ao PBS
0	0	78.6 ± 2.1	78.6 ± 2.1
66	0.000001	71.0 ± 3.0	71.0 ± 2.0
66	0.004	64.0 ± 1.0	69.5 ± 4.5
66	0.006	67.5 ± 3.5	69.0 ± 1.0
132	0.000001	64.5 ± 2.5	71.0 ± 4.0
132	0.004	74.5 ± 0.5	72.0 ± 1.0
132	0.007	72.5 ± 3.5	65.5 ± 0.5

Entre estes grupos a análise estatística demonstrou que houve diferença significativa ( $p < 0.05$ ) entre macrófagos que não foram expostos ao etanol e zinco ou água e PBS, em relação ao grupo de macrófagos exposto ao etanol a 66 mM associado ao zinco a 0.004 mM. E também, em relação ao grupo de macrófagos exposto ao etanol a 132 mM associado ao zinco a 0.000001 mM, e ainda, ao grupo controle referente ao etanol a 132 mM associado ao zinco a 0.007 mM.

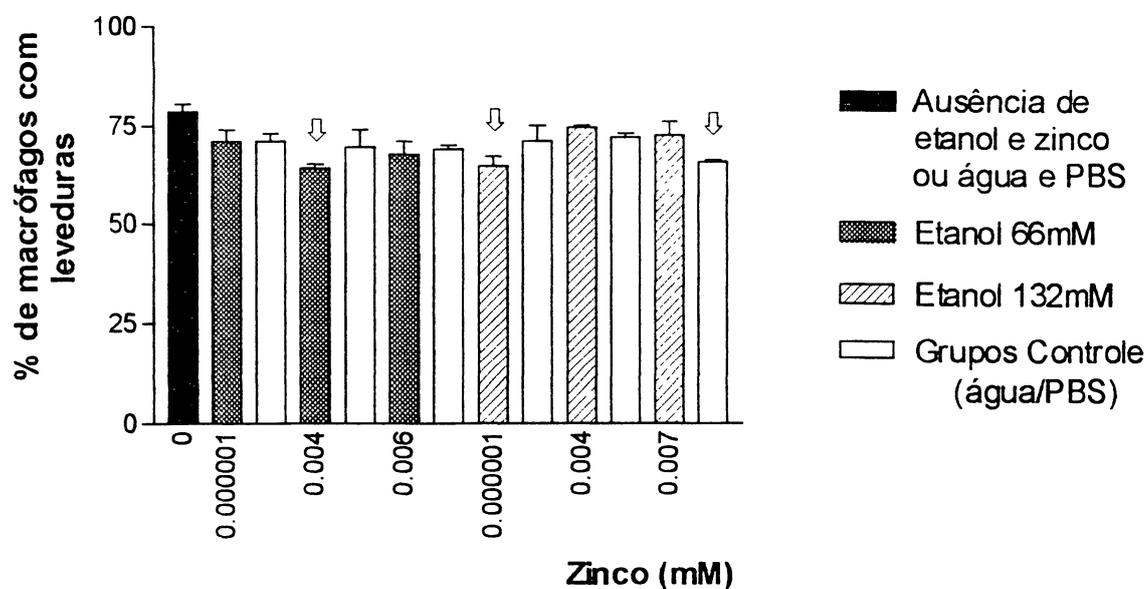


Figura 25 - Efeito do etanol associado ao zinco durante 24 horas sobre macrófagos peritoneais em cultura celular, que foram posteriormente incubados com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* por 60 minutos, a fim de avaliar a fagocitose. Cada coluna representa a média  $\pm$  epm do percentual de macrófagos com leveduras nas diferentes concentrações de etanol associado às diferentes concentrações de zinco e seus respectivos controles com água e PBS, e ainda, uma coluna representada pela ausência destes compostos. Houve diferença estatística significativa ( $p < 0.05$ ) entre o grupo não exposto aos compostos e os grupos marcados.

Na figura 26, foi comparado o índice fagocítico de macrófagos expostos ao etanol e zinco ou macrófagos expostos à água e PBS, e também, em relação ao grupo de macrófagos que não foram expostos a tais compostos; os dados foram expressos como média  $\pm$  epm para cada concentração de etanol associado a cada concentração de zinco, como também, aos seus respectivos controles.

TABELA 26 – Análise do índice fagocítico em macrófagos peritoneais expostos ao etanol e ao zinco em cultura celular por 24 horas.

Etanol (mM)	Zinco (mM)	Índice Fagocítico	
		Expostos ao etanol e ao zinco	Expostos à água e ao PBS
0	0	2.3 ± 0.08	2.3 ± 0.08
66	0.000001	2.1 ± 0.06	1.7 ± 0.14
66	0.004	1.5 ± 0.12	1.7 ± 0.23
66	0.006	1.6 ± 0.22	1.4 ± 0.01
132	0.000001	1.5 ± 0.13	1.8 ± 0.16
132	0.004	1.8 ± 0.17	1.8 ± 0.10
132	0.007	1.9 ± 0.19	1.8 ± 0.01

Entre estes grupos a análise estatística demonstrou que houve diferença significativa ( $p < 0.01$ ) entre o grupo de macrófagos não exposto aos compostos em relação ao grupo de macrófagos exposto ao etanol a 66mM associado ao zinco 0.004mM, e também, em relação ao controle referente ao etanol a 66mM associado ao zinco a 0.006 mM. E ainda, em relação ao grupo de macrófagos exposto ao etanol a 132 mM associado ao zinco a 0.000001mM. E diferença significativa ( $p < 0.05$ ) do grupo de macrófagos não exposto em relação ao grupo de macrófagos exposto ao etanol a 66mM e ao zinco a 0.006mM, e em relação ao controle referente ao grupo exposto ao etanol a 66mM associado ao zinco a 0.000001mM.

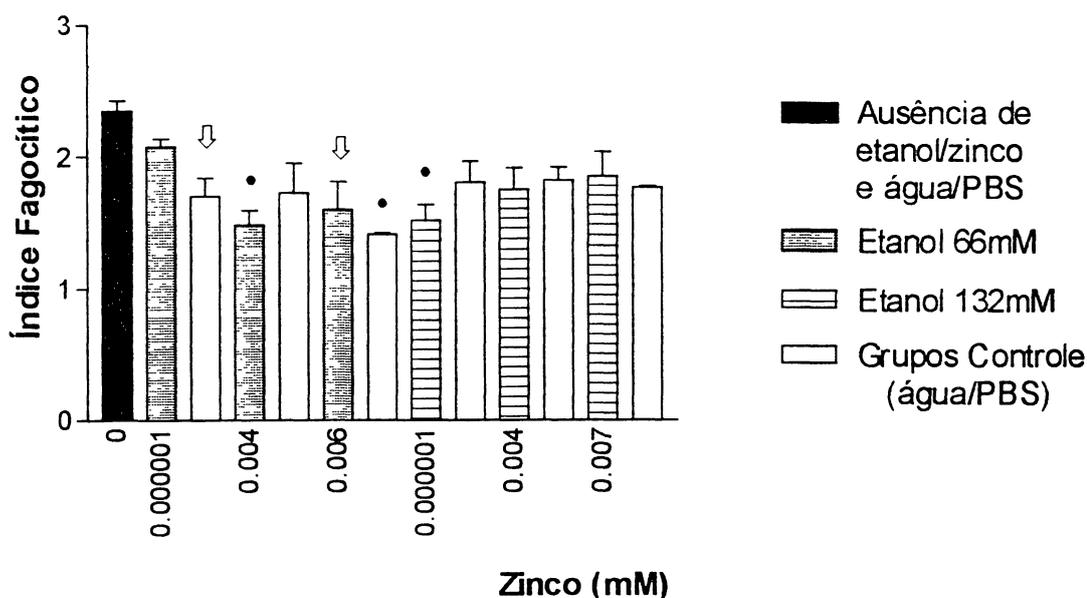


Figura 26 - Efeito do etanol associado ao zinco durante 24 horas sobre macrófagos peritoneais em cultura celular, que foram posteriormente incubados com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* por 60 minutos. Cada coluna representa a média  $\pm$  epm do índice fagocítico nas diferentes concentrações de etanol associado às diferentes concentrações de zinco e seus respectivos controles com água e PBS, e ainda, uma coluna representada pela ausência destes compostos. Houve diferença estatística significativa ( $p < 0.01$ ) entre o grupo de macrófagos não exposto aos compostos e os grupos marcados com •. E ainda, diferença estatística significativa ( $p < 0.05$ ) entre o grupo não exposto e os grupos assinalados com ↓.

Quando o etanol foi associado ao zinco, o etanol provocou interferência na utilização deste microelemento por macrófagos; pois a resposta fagocitária na concentração mais baixa de zinco (0.000001 mM) utilizada neste protocolo não foi mantida.

## 5 DISCUSSÕES

Numa primeira etapa deste estudo teve-se como objetivo avaliar o efeito do etanol sobre macrófagos *in vitro*, particularmente em relação a resposta fagocitária. O etanol tem mecanismo de ação prejudicial ao sistema imune, provocando decréscimo de suas funções.

A análise do gráfico 1 demonstra que em relação ao percentual de macrófagos que englobaram leveduras, (ou seja, macrófagos com atividade fagocítica), quando expostos ao etanol em diferentes concentrações e num período constante de 24 horas, não houve diferença significativa quanto a taxa de fagocitose, ou seja, todos os grupos mantiveram a fagocitose em proporções similares.

Por outro lado, a análise do gráfico 2 demonstra que o índice fagocítico, ou seja, o número médio de leveduras por macrófago forma uma curva irregular, com índice fagocítico na concentração de etanol a 66mM praticamente igual ao grupo controle (com ausência de etanol). A partir deste ponto, essa curva decresce a medida que a concentração de etanol aumenta, ou seja, o número de leveduras fagocitadas por macrófago sofre uma redução; portanto comparando-se com o gráfico 1 pode-se concluir que a função fagocitária permanece íntegra, porém, o número de leveduras fagocitadas diminui com o aumento na concentração de etanol. Entretanto, na concentração mais elevada de etanol (de 264mM) a curva do índice fagocítico torna-se novamente ascendente. Até o presente momento não foi possível elucidar o fenômeno.

O estudo de NILSSON et al. (1996) pesquisou os efeitos *in vitro* do etanol sobre neutrófilos. A concentração de etanol utilizada foi de 170 mM, sendo que a fagocitose não foi afetada. No presente estudo, embora o modelo celular não tenha sido o mesmo e as concentrações de etanol foram inferiores e superiores a esta; considerando a dosagem de 170mM uma faixa intermediária, pode-se concluir que, em ambos os estudos, o etanol não interferiu na fagocitose.

Embora com modelo celular distinto, além do tempo de exposição ao etanol ser diferente do protocolo utilizado no presente estudo, a pesquisa de AROOR e BAKER (1998), que relaciona o efeito do etanol sobre a fagocitose em microglia traz informações que podem esclarecer alguns aspectos dos resultados apresentados. Nesta pesquisa *in vitro* as células (microglia) foram expostas ao etanol numa concentração de 100mM por seis dias, e a fagocitose foi avaliada por incubação com *E. coli* por 30 minutos a 37° C. Os autores constataram uma significativa supressão da fagocitose após incubação com etanol.

Pode-se concluir que em ambos estudos os efeitos de exposição ao etanol em condições de cultura celular permitiu avaliar o efeito direto do etanol na função imune destas células, independentemente de efeitos sistêmicos.

Um dos aspectos mais importantes e relevantes são os recentes dados mostrando que o etanol altera seletiva e especificamente a função de várias proteínas ligadas à membrana (GONZALES; HOFFMAN, 1991; SAMSON; HARRIS, 1992<sup>26</sup>, citados por BITTEENCOURT, 2000), desafiando a hipótese, chamada de “hipótese de membrana” (TABAKOFF; HOFFMAN, 1987<sup>27</sup>, citados por BITTENCOURT, 2000), onde o etanol é considerado “uma droga não-específica” e que produz certos efeitos fisiopatológicos, desequilibrando os componentes lipídicos das membranas celulares.

Diferenças importantes nos mecanismos moleculares relacionados à fagocitose mediada por diferentes receptores foram recentemente avaliadas (ADEREM; UNDERHILL, 1999, p. 593); estas respostas funcionais foram mediadas por estímulos que provocam alterações nos receptores de superfície de membrana (NILSSON et al., 1996, p. 225). Há vários fatores que podem estar relacionados: elementos do citoesqueleto, graus de maturação de componentes do sistema endossômico-lisossômico e variações nas respostas inflamatórias (ADEREM;

---

<sup>26</sup> GONZALES, R. A.; HOFFMAN, P. L. Receptor-gated ion channels may be selective CNS targets for ethanol. *Trends Pharmacol Sci.*, v. 12, p. 1-3, 1991; SAMSON, H. H.; HARRIS, R. A. Neurobiology of alcohol abuse. *Trends Pharmacol Sci.*, v. 13, p. 206-211, 1992.

<sup>27</sup> TABAKOFF, B.; HOFFMAN, P. L. Biochemical pharmacology of ethanol. In: MELTZER, H. Y. (Ed.). *Psychopharmacology: the third generation of progress*. New York: Raven Press, 1987. p. 1521-1526.

UNDERHILL, 1999, p.593). Pode-se atribuir ao etanol a influência na expressão ou função destes receptores (NILSSON et al., 1996, p. 225).

Os efeitos de exposição ao etanol produzem supressão de função do macrófago *in vivo*, mas não *in vitro* como foi publicado em alguns estudos; esta variabilidade pode ser explicada pelas condições de cultura celular (ARROR; BAKER, 1998).

A análise das figuras 3 e 4, demonstrou que o percentual de macrófagos que fagocitaram leveduras e o índice fagocítico, respectivamente, de macrófagos do grupo controle, por um período constante de 24 horas, não apresentou diferença estatística significativa em relação à fagocitose. Porém, mesmo a fagocitose não sendo afetada em nenhum grupo, o índice fagocítico apresentou diferenças significativas nos volumes de 110 e 330 ul, onde a média de leveduras fagocitadas por macrófago apresentou-se reduzida.

A interpretação da figura 4 ficou dificultada pela irregularidade do experimento, ou seja, se com o acréscimo de 110 ul de água houve decréscimo do índice fagocítico, o esperado seria que aumentando progressivamente o volume de água consecutivamente o índice fagocítico decresceria, e isto não ocorreu.

Baseando-se na análise comparativa dos resultados apresentados nas figuras 5 e 6, que permitiu a avaliação da fagocitose e conseqüentemente, do índice fagocítico, entre macrófagos expostos ao etanol e macrófagos do grupo controle, conclui-se que na figura 5 não houve diferença estatística significativa entre os grupos. Assim sendo, o etanol nestas concentrações e sob estas condições de cultura celular não prejudicou ou causou inibição da resposta imune em relação à função fagocítica.

Na figura 6, em relação ao índice fagocítico ficou demonstrado que a média de leveduras internalizadas por macrófago na ausência de etanol e água é semelhante a concentração mais baixa de etanol, ocorreu então uma redução do índice fagocítico com a água no mesmo volume e praticamente não ocorreram alterações significativas até a maior concentração de etanol, onde o índice fagocítico eleva-se novamente,

formando uma curva invertida ( $\cup$ ), enquanto o resultado esperado seria uma reta linear descendente. Até o presente momento não foi possível elucidar o resultado encontrado.

Pode-se concluir após aplicação do protocolo que a água não foi o controle adequado, pois a água pode ter interferido na diluição dos nutrientes do meio de cultura, alterando o equilíbrio do meio e portanto causando prejuízo nutricional às células, como também, ter interferido na tonicidade celular. O mais apropriado deveria ter sido utilizar o próprio meio de cultura DMEM para adequar a concentração de etanol e dos micronutrientes, eliminando a utilização da água e do PBS como controle dos experimentos, e por sua vez, minimizando as variáveis.

A vitamina C ou ácido ascórbico foi incluída neste estudo, porque estudos prévios demonstraram que dietas enriquecidas com antioxidante estimulam o sistema imune (DEL RIO et al., 1998, p.871). Assim sendo, a vitamina C foi incluída neste estudo com o objetivo de avaliar o seu efeito, provavelmente benéfico, sobre a fagocitose. E depois relacionar o efeito da vitamina C juntamente com o uso de etanol.

Por meio dos resultados obtidos e demonstrados na figura 7, foi comparado o percentual de macrófagos com leveduras expostos a concentrações diferentes de vitamina C (0.01, 0.1 e 0.3 mM), durante 24 horas, e seus respectivos controles (PBS), ficou claro, que não houve diferença significativa entre os grupos, ou seja, a vitamina C em nenhuma das concentrações aumentou a taxa fagocitária dos macrófagos.

Na análise da figura 8, o índice fagocítico, apresentou-se reduzido após incubação com todas as concentrações de vitamina C usadas no protocolo, e seus respectivos controles, quando comparado ao grupo de macrófagos que não foram expostos nem à vitamina C e nem ao PBS. Desta forma pode-se demonstrar que na presença de vitamina C a fagocitose não foi alterada, porém, o número médio de leveduras internalizadas por macrófago sofreu significativa redução na presença de vitamina C e mesmo do PBS.

Assim sendo, o resultado deste estudo foi inverso ao esperado, pois com o acréscimo de vitamina C, um elemento antioxidante, não houve aumento da

fagocitose, e conseqüentemente não foi observado efeito estimulante sobre o sistema imune.

Pesquisas realizadas por DEL RIO et al. (1998) e VICTOR et al. (2000), com protocolos similares, estudaram os efeitos da vitamina C em macrófagos peritoneais. Houve um efeito significativo quanto ao índice fagocítico após incubação em todas concentrações com vitamina C. Embora duas concentrações utilizadas de ácido ascórbico ou vitamina C (0.01 e 0.1 mM), também foram utilizadas no presente estudo, existem muitas variáveis, como: tempo de exposição à vitamina, materiais utilizados, concentração final dos compostos, metodologia e outros, que dificultam a comparação quanto ao resultado final.

Os resultados obtidos podem ter como base uma suplementação "inadequada", ou seja, as concentrações de vitamina C utilizadas terem sido baixas ou insuficientes; desta forma pode-se não ter constituído uma suplementação real. Como os valores aplicados neste estudo foram baseados em meios de cultura desenvolvidos pela SIGMA (apêndice 2), talvez não caracterizassem suficiente suplementação. Essa suposição pode ser reforçada pelos resultados obtidos no estudo de DEL RIO et al. (1998), no qual a concentração de vitamina C (1mM) *in vitro* mostra o efeito máximo em todas funções do macrófago, ou seja, não apenas relacionada à fagocitose ou capacidade de ingestão do macrófago, mas também, aderência ao substrato e migração. E o estudo de DALLEGRI, LANZI e PATRONE (1980), sobre o efeito de ácido ascórbico na locomoção de macrófagos, mostra que um aumento significativo na quimiotaxia ocorre com a concentração de ácido ascórbico a 5mM. Na concentração de 1mM foi mostrado um aumento na locomoção de células na ausência de estímulos, portanto, percebe-se influência da vitamina C sobre a locomoção de células, porém, a medida que a concentração de vitamina C aumenta, a resposta quimiotáxica, que é uma resposta mais específica, mostrou-se aumentada.

Outro aspecto importante descrito nos estudos de DEL RIO et al. (1998) e VICTOR et al. (2000) refere-se ao tempo de exposição dos macrófagos à vitamina C.

Nestes trabalhos, o tempo de exposição à vitamina foi de 30 minutos concomitantemente com o componente a ser fagocitado (*latex beads*); e no presente estudo, o tempo de exposição foi de 24 horas, e 60 minutos de interação com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

Portanto este protocolo poderia ser novamente aplicado utilizando-se a vitamina C na concentração mínima de 1 mM até 5 mM. E a vitamina e o componente a ser fagocitado, poderiam ser adicionados ao meio, concomitantemente, por um período de 30 a 60 minutos.

A análise dos resultados da figura 9 demonstrou que após ser comparado o grupo de macrófagos expostos ao etanol e vitamina C e macrófagos do grupo controle, comparou-se também, aos macrófagos que não foram expostos aos compostos já citados. Em relação ao percentual de macrófagos que fagocitaram leveduras, o único grupo que apresentou diferença estatística significativa ( $p < 0.05$ ) foi o etanol na concentração de 198mM associado com a vitamina C a 0.3mM quando comparado ao seu controle com água e PBS. Mas, a análise geral do gráfico demonstrou que nesta concentração de etanol e vitamina C, bem como, nas concentrações de etanol 264mM associada às três concentrações de vitamina C houve um aumento no percentual de macrófagos que englobaram leveduras. Mesmo que pela análise estatística não tenha sido apontada diferença significativa entre os grupos, vale ressaltar este aumento nesta dosagem de etanol; pois, existe uma relação com o resultado apresentado anteriormente na figura 2, onde o índice fagocítico também sofre um aumento na concentração de etanol 264mM.

A análise dos resultados apresentados na figura 10, que também comparou macrófagos expostos ao etanol e vitamina C e macrófagos expostos à água e PBS (controle), avaliando o índice fagocítico, veio reforçar os resultados demonstrados anteriormente, pois a diferença estatística significativa ( $p < 0.05$ ) foi encontrada no grupo incubado com etanol na concentração de 264mM associado com a vitamina C a 0.02mM e no grupo com etanol na mesma concentração associado a vitamina C a

0.6mM e o seu respectivo controle com água e PBS. Novamente, ocorre um aumento em relação ao índice fagocítico na concentração de etanol 264mM, mas este aumento no índice fagocítico decresce a medida que a concentração de vitamina C aumenta. Estes dados reforçam os resultados obtidos na figura 8, onde a exposição dos grupos à vitamina C comparado com o grupo que não foi exposto à vitamina C, levou a uma redução no índice fagocítico.

A análise das figuras 11 e 12, demonstraram que ao se comparar macrófagos expostos à três concentrações diferentes de vitamina A (0.0001mM, 0.0003mM e 0.0009mM) e seus respectivos controles, como também, correlacionando com macrófagos que não foram expostos nem à vitamina A e nem ao PBS, pode-se constatar, que o percentual de macrófagos com atividade fagocitária e o respectivo índice fagocítico, pela análise estatística, não demonstraram diferença significativa entre estes grupos.

Portanto, pode-se observar que a vitamina A nestas concentrações não proporcionou benefícios ou incremento do percentual de macrófagos que englobaram leveduras e nem aumento do índice fagocítico. Não foi observada alteração na função imune em relação à fagocitose, pois também não houve redução do índice fagocítico.

Na figura 13, observa-se o percentual de macrófagos que fagocitaram leveduras. Pode-se comparar a função fagocítica de macrófagos expostos ao etanol e vitamina A em relação aos seus respectivos controles com água e PBS, e ainda, macrófagos com ausência destes compostos. Demonstrou-se que houve diferença estatística significativa dos grupos expostos ao etanol e vitamina A nas diferentes concentrações em relação ao grupo de macrófagos não exposto, mas, entre os grupos expostos às quatro diferentes concentrações de etanol associadas uma a uma às três concentrações de vitamina A, não houve diferença estatística significativa entre os grupos. Desse forma, mesmo na presença de etanol, a vitamina A poderia aumentar a função fagocítica dos macrófagos, e conseqüentemente a resposta imune. Esta suposição poderia ser reforçada após comparar-se a figura 13 com a figura 5, onde

macrófagos expostos ao etanol ou à água (controle) não apresentaram diferença estatística significativa ( $p < 0.05$ ) entre os grupos, mesmo em relação ao grupo de macrófagos não exposto. Além disso, os resultados obtidos apontados na figura 11, mostram que macrófagos expostos à vitamina A em diferentes concentrações e PBS (controle) também não apresentaram diferença estatística significativa ( $p < 0.05$ ) entre os grupos.

A análise da figura 14, mostra resultados semelhantes à figura 13. Houve diferença estatística significativa entre o grupo controle de macrófagos em relação a alguns grupos expostos ao etanol e vitamina A ou água e PBS, porém entre estes grupos não houve diferença estatística significativa. Entretanto, ao se comparar a figura 14 com a figura 6, pode-se notar que quando o etanol foi associado à vitamina A, não houve aumento em relação ao índice fagocítico na concentração de etanol a 264mM, não apresentando diferença estatística significativa ( $p < 0.05$ ) quando comparado aos demais grupos. Ao se comparar a figura 14 com a figura 12, onde foi analisado o índice fagocítico de macrófagos expostos à vitamina A em relação ao PBS, pode-se concluir que na figura 14 houve diferença estatística significativa em relação ao grupo de macrófagos não exposto aos compostos. Este perfil não ocorreu na figura 12, onde não houve diferença significativa entre os grupos.

Entretanto, essas suposições em relação ao efeito da vitamina A em aumentar o percentual de macrófagos que englobaram leveduras e o índice fagocítico quando associada ao etanol não podem ser confirmadas devido ao controle com água e PBS, pois não ocorreu diferença estatística significativa ( $p < 0.05$ ) entre os grupos; assim sendo, não se pode afirmar que a vitamina A tenha causado aumento no percentual de macrófagos que fagocitaram, bem como do índice fagocítico.

Comparando-se o efeito da vitamina A ao efeito da vitamina C em relação a função fagocítica de macrófagos (figuras 13 e 14 e figuras 9 e 10) o efeito da vitamina A foi superior ao efeito da vitamina C.

Comparando-se esta pesquisa com a publicação de GOLDMAN (1984, p.

91-97), novamente aparece o fator de baixa concentração de vitamina utilizada neste protocolo; pois a pesquisa de GOLDMAN mostrou que a medida que a concentração de ácido retinóico aumenta, a capacidade fagocítica também foi superior, atingindo o melhor resultado com o ácido retinóico a 0.001mM. Para esta análise, os parâmetros de avaliação foram similares, pois a autora, também usou o percentual de macrófagos que fagocitaram leveduras e o índice fagocítico; como também, metodologia semelhante. Porém, as células utilizadas foram macrófagos da linhagem P388D1. Outro aspecto que merece consideração foi o tempo de exposição das células ao ácido retinóico em cultura celular; pois os resultados da pesquisa de GOLDMAN mostraram maior capacidade fagocítica com 96 horas de exposição, não sendo tão efetivo, com 48 e 23 horas de exposição, e nenhum aumento significativo, foi detectado, quando a exposição foi de apenas 4 horas. Ressaltando, que nesta pesquisa, o tempo de exposição à vitamina A foi de 24 horas.

KATZ et al. (1987), demonstraram que a vitamina A e o ácido retinóico podem influenciar a resposta proliferativa de macrófagos *in vitro*. O efeito da vitamina A e do ácido retinóico foi similar, porém, a vitamina A teve efeito superior à proliferação quando comparada ao retinóide sintético.

Na pesquisa de DILLEHAY, WALI e LAMON (1988), que comparou o efeito de três tipos distintos de retinóides sobre a fagocitose de macrófagos peritoneais de camundongos e macrófagos da linhagem (RAW 264) em cultura celular, constatou que mesmo concentrações baixas de retinóides (como 0.0001mM e até mesmo concentrações inferiores), causam um aumento significante na fagocitose.

Mas em contrapartida, a pesquisa de RHODES e OLIVER (1980), com macrófagos expostos a diferentes concentrações de vitamina A e ácido retinóico (*in vitro*), demonstraram que ambos, mesmo em concentrações fisiológicas, suprimiram a expressão de receptores Fc e subseqüentemente a fagocitose de células opsonizadas.

Os resultados de muitos estudos com vitamina A e retinóides *in vitro* dependem da linhagem celular, condições de cultura, fase de diferenciação da célula,

concentração da vitamina A e método de exposição da célula à vitamina. Pode-se concluir que a extrapolação para condições *in vivo* deve ser feita com precaução (SEMBA, 1998), além de serem necessários estudos com outros fatores que possam estar envolvidos.

A análise das figuras 15 e 16, demonstrou que comparando-se macrófagos expostos à três concentrações diferentes de vitamina D<sub>3</sub> (0.0001mM, 0.0003mM e 0.0009mM) e seus respectivos controles, onde os macrófagos foram expostos ao PBS, como também, comparando-se com macrófagos que não foram expostos nem à vitamina D<sub>3</sub> e nem ao PBS, pode-se constatar, pela análise estatística, que o percentual de macrófagos que fagocitaram foi maior quando expostos às três concentrações de vitamina D<sub>3</sub>. Entretanto, não se pode atribuir esse aumento ao efeito da vitamina pois o mesmo ocorreu com a exposição ao PBS. Em relação ao índice fagocítico, não houve diferença estatística significativa entre os grupos.

A análise das figuras 17 e 18, apresenta as mesmas conclusões do parágrafo supra citado. Na figura 17, na qual a vitamina D<sub>3</sub> foi associada ao etanol, e seus respectivos controles foram expostos à água e PBS, em praticamente todas as concentrações o percentual de macrófagos que fagocitaram leveduras foi maior em relação ao grupo de macrófagos não expostos a estes compostos, mas por outro lado, a análise estatística demonstrou que entre os grupos nas diferentes concentrações etanol e vitamina D<sub>3</sub> e água e PBS não houve diferença significativa. Conclui-se, portanto, que o aumento no percentual de macrófagos que englobaram leveduras não pode ser atribuído ao efeito do etanol e vitamina D<sub>3</sub>, quando comparado aos grupos controles.

Na figura 18, em relação ao índice fagocítico, mesmo quando a vitamina D<sub>3</sub> foi associada ao etanol e o PBS à água, a conclusão foi a mesma da figura 16, não houve diferença estatística significativa praticamente em relação a todos os grupos, e as diferenças apresentadas não alteraram as conclusões; ou seja, o índice fagocítico foi semelhante em praticamente todos os grupos, portanto o efeito da vitamina D<sub>3</sub> não pode ser comprovado, por não ter interferido no número de leveduras fagocitadas

pelos macrófagos.

Concluiu-se que, a vitamina D<sub>3</sub> nestas concentrações e sob as condições de cultura já mencionadas não exerceu um efeito significativo em relação à função fagocítica em macrófagos, e conseqüentemente na função imune.

Na pesquisa de BAR-SHAVIT et al. (1981), onde muitos aspectos metodológicos apresentaram semelhanças à nossa pesquisa, a resposta fagocítica de macrófagos peritoneais de ratos foi prejudicada pela deficiência de vitamina D<sub>3</sub>, e após incubação com a vitamina D<sub>3</sub> (*in vitro*) esta deficiência foi corrigida e a função fagocítica restaurada. Os autores afirmam que a função fagocítica está diretamente relacionada com o metabolismo da vitamina D<sub>3</sub>, sugerindo que esta vitamina exerça um papel regulatório no estado funcional normal do fagócito. E a deficiência desta vitamina afeta os macrófagos tanto *in vitro* como *in vivo*. O interessante na comparação entre este estudo e nossa pesquisa é que os resultados também foram semelhantes, pois, macrófagos peritoneais de ratos normais (sem carência vitamínica) não apresentaram aumento significativo na fagocitose quando expostos à vitamina. Mas, macrófagos peritoneais retirados de ratos com carência vitamínica, que demonstraram prejuízo na resposta fagocítica quando comparados à macrófagos de ratos normais, quando expostos à vitamina D<sub>3</sub> apresentaram aumento significativo na atividade fagocítica. Ainda nesta pesquisa, foi sugerido pelos autores que o efeito corretivo específico da vitamina D<sub>3</sub> no prejuízo da função fagocítica de macrófagos retirados de ratos com deficiência vitamínica, está relacionado com a presença de receptor celular para esta vitamina e biossíntese específica, ou eventos organizacionais governados por esta.

Na pesquisa de XU et al. (1993), apesar das diferenças quanto ao tipo celular estudado e metodologia, foi avaliada a viabilidade celular e a capacidade fagocítica *in vitro* em monócitos quando expostos à vitamina D<sub>3</sub>; sendo que os resultados obtidos nesta pesquisa reforçam os resultados encontrados na nossa pesquisa. Quanto a viabilidade celular, a taxa de monócitos expostos à vitamina D<sub>3</sub> ou não expostos

(controle) - que nesta pesquisa foram expostos à mesma quantidade de etanol (meio de diluição da vitamina) demonstrou não haver diferença significativa entre os grupos. Somente em alguns casos, o tratamento com a vitamina D<sub>3</sub> revela uma melhora dos grupos expostos quando comparados aos seus controles.

Em relação a capacidade fagocítica, algumas concentrações de vitamina D<sub>3</sub> testadas, não demonstraram diferença significativa entre os grupos expostos à vitamina quando comparados aos grupos não expostos, porém, numa concentração específica houve diferença entre o grupo exposto à vitamina D<sub>3</sub> e o seu controle. Portanto, pode-se observar que o efeito da vitamina D<sub>3</sub> em relação à capacidade fagocítica da célula, depende da concentração da vitamina e do tempo de exposição da célula. Neste estudo, o tempo de exposição à vitamina que resultou num aumento de 50% em relação a capacidade fagocítica, foi de 6 dias; com 2 dias de exposição não foi verificado nenhum efeito da vitamina sobre a fagocitose de monócitos. Em relação a concentração da vitamina, a comparação não foi possível, devido aos parâmetros distintos de avaliação. Comparando esta pesquisa com a nossa, aparece a variável tempo de exposição à vitamina, revelando que na nossa pesquisa, talvez o tempo de exposição em relação a vitamina D<sub>3</sub> tenha sido insuficiente para exercer efeito em relação a atividade fagocítica.

Em relação a exposição dos macrófagos à vitamina B<sub>12</sub> em cultura celular, os resultados apresentados nas figuras 19 e 20, demonstraram que houve diferença estatística significativa entre os grupos de macrófagos expostos à vitamina B<sub>12</sub> nas três diferentes concentrações, quando comparados ao grupo de macrófagos que não foi exposto à vitamina ou ao PBS, podendo-se supor que o efeito da vitamina B<sub>12</sub> tivesse sido prejudicial a atividade fagocítica dos macrófagos. Entretanto não se pode afirmar este efeito da vitamina B<sub>12</sub>, porque quando comparada aos grupos controle, ou seja, macrófagos expostos ao PBS, não ocorreu diferença estatística entre os grupos; neste caso poderia-se supor que a concentração de vitamina B<sub>12</sub> foi insuficiente para caracterizar suplementação, como já foi discutido em relação à vitamina C. Pois as

concentrações utilizadas foram baseadas em concentrações de meios de cultura da SIGMA que continham tais vitaminas (Apêndice 2), e talvez as concentrações das vitaminas pesquisadas fossem apenas as necessárias para manter o metabolismo basal da célula, visto que, essas variações de composição de cada meio ocorrem com o propósito de atender os diversos tipos celulares, oferecendo condições de cultura o mais adequado quanto possível.

Os resultados apresentados nas figuras 19 e 20, referentes a análise comparativa do percentual de macrófagos que fagocitaram leveduras e o índice fagocítico entre macrófagos expostos à vitamina B<sub>12</sub> e macrófagos expostos ao PBS, apresentaram resultados semelhantes aos resultados obtidos com a exposição de macrófagos à vitamina C (estes resultados foram representados nos gráficos 7 e 8) principalmente em relação a análise do índice fagocítico. Esta comparação entre os resultados obtidos com a vitamina B<sub>12</sub> e vitamina C, merece destaque, porque as duas vitaminas são hidrossolúveis.

Como já foi visto na revisão de literatura, nas pesquisas de SKACEL e CHANARIN (1982), e THOMASKUTTY e LEE (1987), a vitamina B<sub>12</sub> influencia algumas funções de neutrófilos e macrófagos; na pesquisa de SKACEL e CHANARIN (1982) e SEGER et al. (1980), pode-se observar que mesmo com deficiência de vitamina B<sub>12</sub> a atividade fagocítica dos neutrófilos permaneceu normal, mas a capacidade de eliminar *Staphylococcus aureus* estava prejudicada. E na pesquisa de THOMASKUTTY e LEE (1987), o grupo de ratos com dieta deficiente em vitamina B<sub>12</sub>, infectado com *Trypanosoma lewisi*, teve seus macrófagos expostos a partículas de látex, com o objetivo de avaliar a atividade fagocítica dos mesmos; o resultado quando comparado aos macrófagos de ratos que receberam dietas normal (completa) e restrita em calorias, apresentaram fagocitose e propagação de macrófagos mais lenta.

Então, observa-se que, mesmo com deficiência de vitamina B<sub>12</sub> a fagocitose ocorre, com velocidade reduzida e funções subjacentes a este processo prejudicadas, mas a fagocitose em si ocorre, isto é fato. Assim sendo, comparando-se

com os resultados obtidos nesta pesquisa, acredita-se que a vitamina B<sub>12</sub> não prejudicou a fagocitose, como pode representar as figuras 19 e 20, quando comparou-se macrófagos expostos a vitamina B<sub>12</sub> e macrófagos não expostos à vitamina, ou mesmo que não teve influência sobre a fagocitose quando comparou-se nas mesmas figuras (19 e 20), macrófagos expostos a três concentrações diferentes de vitamina B<sub>12</sub> aos controles com PBS. Postula-se uma suplementação inadequada, ou seja, insuficiente. E segundo, a revisão de AXELROD<sup>28</sup>, citado por THOMASKUTTY e LEE (1987) sobre vitamina B, a resposta imune mediada por macrófagos pode ter sua eficiência diminuída se as dosagens de vitamina B disponíveis estiverem em quantias subliminares.

A análise das figuras 21 e 22, nas quais foi comparado o percentual de macrófagos com leveduras e o índice fagocítico, entre macrófagos expostos ao etanol e vitamina B<sub>12</sub> e os controles com água e PBS, demonstrou que o resultado obtido foi semelhante ao resultado obtido nas figuras 19 e 20; ou seja, o etanol associado à vitamina B<sub>12</sub> nas diferentes concentrações pesquisadas não alterou os resultados previamente discutidos.

Nas figuras 21 e 22, houve diferença estatística significativa entre o grupo de macrófagos não exposto aos compostos (etanol e vitamina B<sub>12</sub> e água e PBS), em relação aos grupos assinalados nas figuras acima citadas; podendo-se supor que a presença de etanol e vitamina B<sub>12</sub> prejudicaram a fagocitose e o número de leveduras fagocitadas por macrófago. Mas, essa suposição não pode ser confirmada pela análise estatística entre os grupos expostos aos compostos nas suas diferentes concentrações, pois entre estes grupos não houve diferença estatística significativa, ou seja, macrófagos expostos ao etanol e vitamina B<sub>12</sub> apresentaram resultados semelhantes aos macrófagos expostos à água e PBS nas suas diferentes concentrações.

Estes dados permitem observar ainda, comparando as figuras 19 e 20, às

---

<sup>28</sup> AXELROD, A. E. Role of the B vitamins in the immune response. *Adv. Exp. Med. Biol.*, New York, v. 135, p. 93-106, 1981.

figuras 21 e 22, que a introdução de etanol ao meio de cultura, nas diferentes concentrações, considerando já a presença de vitamina B<sub>12</sub> no meio, de um modo geral, não alterou a resposta dos macrófagos em relação a fagocitose e índice fagocítico.

Pela análise dos resultados apresentados nas figuras 23 e 24, que mostram o efeito do zinco sobre a atividade fagocítica de macrófagos, pode-se perceber que tanto o percentual de macrófagos com leveduras, quanto o índice fagocítico tiveram resultados bem semelhantes. O zinco (sulfato de) na menor concentração (0.000001mM) apresentou o maior percentual de macrófagos com leveduras fagocitadas e maior índice fagocítico em relação às outras dosagens de zinco (0.003 e 0.005mM). Esta diferença foi significativa pela análise estatística. E mesmo não sendo uma diferença estatística significativa, pode-se perceber que mesmo em relação ao seu controle, a atividade fagocítica foi superior no grupo de macrófagos exposto ao zinco numa menor concentração. A mesma comparação feita com o grupo de macrófagos exposto a menor concentração de zinco pode ser feita em relação ao grupo de macrófagos que não foi exposto nem ao zinco, nem ao PBS dos grupos controle, ou seja, à medida que a concentração de zinco eleva-se, a atividade fagocítica sofre redução.

Os resultados encontrados nesta pesquisa foram reforçados pelos resultados semelhantes da pesquisa de SCHLESINGER et al. (1993), onde monócitos do sangue de crianças com marasmo em reabilitação nutricional foram coletados, plaqueados, expostos a *Candida albicans*, corados com Giemsa e avaliada a atividade fagocítica. Comparou-se monócitos de crianças que receberam suplementação dietética com zinco e crianças que não receberam, e os resultados sugeriram que a suplementação com zinco prejudicou a capacidade fagocítica.

Na pesquisa de WIRTH, FRAKER e KERSZENBAUM (1984), na qual a fagocitose de macrófagos de ratos que foram alimentados durante 28 dias com dietas específicas, também demonstrou que o percentual de macrófagos que fagocitaram partículas de látex foi maior no grupo de macrófagos que recebeu dieta deficiente em

zinco, seguido pelo grupo que recebeu dieta restrita em zinco (quando comparada a dieta adequada) e o grupo que recebeu dieta adequada em zinco. Portanto, a presença de zinco trouxe prejuízo à fagocitose.

Nos estudos de GHASSEMIFAR et al. (1995) foi investigado o efeito do zinco sobre a fagocitose de macrófagos de ratos em período pós-operatório, o resultado foi similar aos resultados encontrados nas outras pesquisas, ou seja, os macrófagos de ratos deficientes em zinco apresentaram resposta fagocitária semelhante aos macrófagos dos ratos controle. A metodologia utilizada naquele estudo para avaliação da atividade fagocítica foi similar a metodologia utilizada em nessa pesquisa e nas outras investigações acima citadas.

Foi demonstrado que, em homens adultos saudáveis que ingeriam grandes dosagens de zinco, houve uma redução na quimiotaxia e atividade fagocítica de PMN (polimorfonucleares). Enquanto dosagens moderadas de zinco podem ser benéficas, a ingestão diária de altas suplementações por períodos prolongados pode trazer efeitos deletérios (CHANDRA<sup>29</sup>, citado por SCHLESINGER et al., 1993). Foram propostos vários mecanismos pelos quais o zinco poderia inibir a fagocitose em altas concentrações: bloqueando locais de receptores de membrana, alterações na fluidez de componentes de membrana ou interferência com os efeitos do cálcio nas atividades do citoesqueleto da célula (LENNARD,<sup>30</sup> citado por SCHLESINGER et al., 1993).

São apenas suposições, pois nem esta pesquisa, e nem os resultados da pesquisa de SCHLESINGER et al. (1993), permitem uma discussão detalhada dos mecanismos pelos quais o zinco interfere na fagocitose.

Nas figuras 25 e 26, que tratam dos macrófagos que foram expostos ao zinco

---

<sup>29</sup> CHANDRA, R. K. Excessive intake of zinc impairs immune response. *JAMA*, Chicago, v. 252, p. 1443-6, 1984.

<sup>30</sup> LENNARD, E. S. Implications in the burn neutrophil of serum and cellular zinc levels. *J. Surg. Res.*, Orlando, v. 29, p. 75-82, 1980.

e etanol concomitantemente, os resultados mostram-se diferentes, isto é, com a exposição ao etanol mesmo concentrações baixas de zinco não apresentaram diferença significativa entre os grupos, tanto em relação ao percentual de macrófagos com leveduras quanto ao índice fagocítico. Pode-se supor que o etanol tenha causado inibição do efeito do zinco em baixas dosagens, em relação a atividade fagocítica. Nestes resultados houve diferença estatística significativa entre o grupo de macrófagos não exposto e as dosagens mais altas de zinco, reforçando os resultados obtidos nos gráficos anteriores nos quais, não havia a presença de etanol; mas este resultado não pode ser reforçado porque ocorre diferença significativa também na menor concentração de zinco associada a concentração maior de etanol, e embora esta diferença não seja significativa, observa-se que nesta concentração de etanol (132mM), a medida que a concentração de zinco se eleva, eleva-se também a atividade fagocítica, ficando claro, que o etanol associado ao zinco alterou o resultado encontrado apenas com a exposição ao zinco. Ou seja, em relação aos mecanismos de fagocitose, o etanol interfere na utilização do zinco por macrófagos.

Após avaliação dos resultados encontrados não poderia-se utilizar a terapêutica nutricional com suplementação de micronutrientes na fase de reabilitação de alcoolistas com o objetivo de beneficiar o sistema imune, pois a maioria dos resultados mostrou não haver efeito significativo dos micronutrientes sobre a resposta fagocitária de macrófagos peritoneais. Porém, os resultados encontrados nesta pesquisa e os resultados obtidos nas diversas publicações citadas permitem afirmar que são resultados prematuros, porque ainda ocorrem muitas controvérsias. Assim sendo, existe a possibilidade para que ocorram modificações e ajustes no protocolo utilizado com o objetivo de aprofundar os conhecimentos e a inter-relação sobre alcoolismo, sistema imune e nutrição.

Há muitas possibilidades a serem experimentadas a fim de verificar se a suplementação com micronutrientes na fase de reabilitação do alcoolista traria benefícios significativos ao sistema imune. Poderia-se induzir o alcoolismo

experimental em camundongos e após a indução, utilizar macrófagos peritoneais para posterior avaliação da fagocitose. E usar macrófagos peritoneais de um grupo controle de camundongos que não sofreram a indução de alcoolismo. E numa segunda etapa experimentar o efeito de micronutrientes em cultura celular em ambos os grupos. Ou utilizar a suplementação com micronutrientes também em animal íntegro, para posterior coleta de macrófagos e parâmetros de avaliação.

Como já foi discutido anteriormente limitar as variáveis, utilizar meio de cultura para adequar as concentrações do etanol e dos micronutrientes, a fim de evitar alterações no meio que possam interferir no resultado final do experimento. Modificar concentrações de micronutrientes e mesmo do etanol, utilizando maiores concentrações de micronutrientes e determinando qual concentração de etanol causa citotoxicidade celular.

Outra variável que pode ser estudada sobre outros aspectos é a incubação com o componente a ser fagocitado, que pode ser introduzido no meio de cultura concomitantemente com o etanol e micronutrientes, ou posteriormente, como ocorreu neste protocolo, e então fazer uma análise comparativa.

O tempo de exposição aos componentes ou compostos a serem pesquisados, e ao material a ser fagocitado é outra variável que pode ser explorada de formas diferentes.

Como também, avaliar outras células do sistema imune e ainda, expandir os parâmetros de avaliação. Enfim, são inúmeras possibilidades que abrem um amplo campo para pesquisa e fundamentação científica.

## 6 CONCLUSÃO

Usando-se como parâmetros de avaliação o percentual de macrófagos que fagocitaram leveduras (*S. cerevisiae*) e o índice fagocítico, pode-se concluir que:

O etanol não exerceu efeito detectável sobre a resposta fagocitária. Mas em relação ao índice fagocítico, a medida que a concentração de etanol aumentou o índice fagocítico sofreu redução. Entretanto, na concentração de etanol a 264mM houve novo aumento em relação ao índice fagocítico.

A vitamina C não afetou a fagocitose, porém, o índice fagocítico mostrou-se reduzido.

A vitamina C associada ao etanol, não alterou a resposta fagocitária, mas em relação ao índice fagocítico, ocorreu um aumento significativo, na concentração de etanol a 264mM quando comparado aos demais grupos. Nesta concentração (de etanol a 264mM) a medida que a concentração de vitamina C se eleva, o índice fagocítico se torna menor.

A vitamina A não exerceu efeito detectável na resposta fagocitária. Quando associou-se a vitamina A ao etanol, houve uma melhora na resposta fagocitária, quando comparado ao grupo com ausência destes elementos. Pode-se sugerir que a vitamina A exerça um efeito superior em alcoolistas do que em indivíduos hígidos. Porém, como em relação aos grupos controle com água e PBS, não foi evidenciado esse efeito. Fazem-se necessárias outras avaliações com possíveis alterações no protocolo ou mesmo a utilização de outros parâmetros.

Com a exposição de macrófagos à vitamina D<sub>3</sub> em comparação com macrófagos que não foram expostos à vitamina, foi demonstrado que houve aumento significativo em relação ao percentual de macrófagos com leveduras internalizadas, porém, em relação aos grupos controle com PBS, essa diferença não foi evidente. A vitamina D<sub>3</sub> não promoveu efeito considerável em relação ao índice fagocítico.

Quando os macrófagos foram expostos à vitamina D<sub>3</sub> associada ao etanol, os resultados foram similares à exposição a vitamina D<sub>3</sub> isoladamente. Houve aumento do percentual de macrófagos que fagocitaram leveduras em relação ao grupo de macrófagos que não foi exposto aos compostos, mas não em relação aos grupos expostos à água e PBS. Em relação ao índice fagocítico não ficou evidenciado o efeito da vitamina D<sub>3</sub>. Portanto, não se poderia afirmar que a vitamina D<sub>3</sub> tenha efeito benéfico sobre a resposta fagocitária.

A vitamina B<sub>12</sub> não exerceu efeito importante sobre a resposta fagocitária; e quando comparou-se os grupos expostos à vitamina ao grupo controle com ausência de vitamina B<sub>12</sub> e PBS, a resposta fagocitária dos grupos expostos à vitamina mostrou-se reduzida.

Em relação ao efeito da vitamina B<sub>12</sub> associada ao etanol, os resultados encontrados foram similares aos demonstrados com à exposição a vitamina B<sub>12</sub> isoladamente. A vitamina B<sub>12</sub> não exerceu nenhum efeito sobre a resposta fagocitária, mesmo com a adição de etanol ao meio.

O zinco melhorou a resposta fagocitária numa concentração mínima (0.000001mM), a medida que houve aumento na concentração de zinco, houve redução da resposta fagocitária.

O zinco associado ao etanol provocou interferência na utilização deste microelemento por macrófagos, interferindo nos mecanismos de fagocitose. Com a adição de etanol, mesmo em associação a concentrações baixas de zinco, não levou a diferenças significativas entre os grupos, tanto em relação ao percentual de macrófagos com leveduras internalizadas quanto ao índice fagocítico.

Pode-se concluir que as vitaminas hidrossolúveis (C e B<sub>12</sub>) promoveram respostas fagocitárias semelhantes, não exercendo efeito considerável sobre a fagocitose. Pode-se supor que seja, por suplementação inadequada, pois, as concentrações de vitaminas hidrossolúveis utilizadas neste protocolo terem sido baixas.

As vitaminas lipossolúveis (A e D<sub>3</sub>), causaram melhor resposta celular quando comparadas às vitaminas hidrossolúveis, porque a vitamina A aumentou a resposta fagocitária em macrófagos expostos ao etanol. Embora os resultados obtidos com a utilização da vitamina D<sub>3</sub> isoladamente, ou associada ao etanol, demonstrou aumento da resposta fagocitária quando comparado ao grupo controle. Há necessidade de posteriores investigações.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, D. O.; HAMILTON, T. A. Molecular basis of macrophage activation: diversity and its origins. In: LEWIS, C.E.; McGEE, J. O'D. **The natural immune system: the macrophage**. Oxford: Oxford University Press, 1992. p. 79
- ADEREM, A.; UNDERHILL, D. M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. **Annual Review of Immunology**, Oxford, v. 17, p. 593-623, 1999.
- ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula**. 3. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. p. 158, 619, 1163.
- AROOR, A. R.; BAKER, R. C. Ethanol inhibition of phagocytosis and superoxide anion production by microglia. **Alcohol**, New York, v. 15, n. 4, p. 277-280, 1998.
- AUGER, M. J.; ROSS, J. A. The biology of the macrophage. In : LEWIS, C. E.; McGEE, J. O'D. **The natural immune system: the macrophage**. Oxford: Oxford University Press, 1992. p. 31.
- BAR-SHAVIT, Z. et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and the regulation of macrophage function. **Calcif. Tissue Int.**, New York, v. 33, p. 673-676, 1981
- BEÇAK, W.; PAULETE, J. **Técnicas de citologia e histologia**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1976 v. 1, p. 245.
- BITTENCOURT, A. L. Mecanismo de ação do etanol: envolvimento de glutamato, gaba e dopamina. **Revista de Psiquiatria Clínica**, São Paulo, v. 27, n. 1, p. 26-31, 2000.
- BONJOUR, J. P. Vitamins and alcoholism. **Internacional Journal of Vitamins and Nutritional Research**, Bern, v. 49, p. 434-441, 1979.
- BRODY, T. **Nutritional biochemistry**. Berkeley, California: Academic Press, 1994. p. 201-207, 377.
- BUCHI, D. F.; SOUZA, W. de. Internalization of surface components during ingestion of *Saccharomyces cerevisiae* by macrophages. **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.**, Bologna, v. 24, n. 1, p. 135-141, 1992.
- BUCHI, D. F., SOUTO-PADRON, T. C. B. S. ; SOUZA, W. de. Internalization of lectin-binding sites during ingestion of *Saccharomyces cerevisiae* by macrophages. **Biocell.**, Mendoza, v. 17, n. 1, p. 1-11, 1993.
- CHANG, C-Y.; TUCCI, M.; BAKER, R.C. Lipopolysaccharide-stimulated nitric oxide production and inhibition of cell proliferation is antagonized by ethanol in a clonal macrophage cell line. **Alcohol**, New York, v. 20, p.37-43, 2000.
- CIPRIANO, I. M. Efeitos do herbicida Tordon 2,4-D 64/240 Tritanolamina Br sobre a ultra-estrutura e fagocitose em macrófagos peritoneais residentes de camundongo. Curitiba, 1994. 89 f. Dissertação (Mestrado em Morfologia - Biologia Celular) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- CUNNINGHAM-RUNDLES, S. Analytical methods for evaluation of immune response in nutrient intervention. **Nutrition Reviews**, Washington, v. 56, p. S27-37, 1998.

- DALLEGRI, F.; LANZI, G., PATARONE, F. Effects of ascorbic acid on neutrophil locomotion. **Int. Archs Allergy Appl. Immun.**, Basel, v. 61, p. 40-45, 1980.
- DAS, I.; BURCH, R. H.; HAHN, H. J. K. Effects of zinc deficiency on ethanol metabolism and alcohol and aldehyde dehydrogenase activity. **Lab. Clin. Med.**, Saint Louis, n. 104, p. 610-617, 1984.
- DEFACQUE, H. et al. Actin assembly induced by polylysine beads or purified phagosomes: quantitation by a new flow cytometry assay **Cytometry**, New York, v. 41, p. 46-54, 2000.
- DEL RIO, M. et al. Improvement by several antioxidants of macrophage function *in vitro*. **Life Sciences**, New York, v. 63, p. 871-881, 1998.
- DIETERT, R. R.; GOLEMBOSKI, K. A. Avian macrophage metabolism. **Poultry Science**, California, v. 77, p. 990-997, 1998.
- DILLEHAY, D. L.; WALI, A. S.; LAMON, E. W. Effects of retinoids on macrophage function and IL-1 activity. **Journal of Leukocyte Biology**, Bethesda, v. 44, p. 353-360, 1988.
- DiPERSIO, J. F.; GOLDE, D. W.; GASSON, J. D. GM-CSF receptor structure and transmembrane signalling. **Int. J. Cell Cloning**, Dayton, v. 8 (Suppl. 1), p. 63-75, 1990.
- FEINMAN, L. Absorption and utilization of nutrients in alcoholism. **Alcohol World, Health & Research**, Washington, v. 13, n. 3, p. 207-210, 1989.
- FELIPE, I.; OLIVEIRA-CASTRO, G. M. Reception-mediated phagocytosis of yeast by macrophage polykarions. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, v. 20, p. 79-91, 1987.
- FONSECA, L. E. P. Complicações clínicas do abuso de substâncias. In: ANDRADE, A. G.; NICASTRI, S.; TONGUE, Eva. **Drogas: atualização em prevenção e tratamento**. São Paulo: Edições Loyola, 1993. p. 154-155.
- FRANCO, G. **Tabela de composição química dos alimentos**. 9 ed. São Paulo: Atheneu, 1992. p. 9, 16, 42-43, 54, 268-269
- GASCON-BARRÉ, M., JOLY, J. G. The biliary excretion of (H<sup>3</sup>)-25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> following chronic ethanol administration in the rat. **Life Sciences**, New York, v. 28, p. 279-286, 1981.
- GHASSEMIFAR, M. R. et al. Impaired function posoperative macrophages from zinc-deficient rats decreases collagen contraction. **APMIS**, Copenhagen, v. 103, p. 395-400, 1995.
- GOLDMAN, R. Effect of retinoic acid on the proliferation and phagocytic capability of murine macrophage-like cells lines. **J. Cell. Physiol.**, New York, v. 120, p. 91, 1984.
- GRAF, J. Avaliação do estado nutricional de alcoólatras. Curitiba, 1988. 144 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Interna) - Universidade Federal do Paraná.
- HARPER, H. A.; RODWELL, V. W.; MAYES, P. A. **Manual de química fisiológica**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 1982. p. 157-158, 168, 191-192.
- HAUG, C. J. et al. Different effect of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on replication of *Mycobacterium avium* in monocyte-derived macrophages from human immunodeficiency virus-infected subjects and healthy controls. **Immunology Letters**, Oxford, v. 63, p. 107-112, 1998.

KATZ, D. R. et al. Regulation of accessory cell function by retinoids in murine immune responses. **Br. J. Exp. Path.**, Oxford, v. 68, p. 343-350, 1987.

KLASING, K.C. Avian macrophages: regulators of local and systemic immune responses. **Poultry-Science**, Savoy, v. 77, p. 983-989, 1998.

KRAUSE, M. V.; MAHAN, L. K. Alimentos, nutrição e dietoterapia. 7. ed. São Paulo: Roca, 1991. p. 129, 166.

LABRO, M. T. Interference of antibacterial agents with phagocyte functions: immunomodulation or "immuno- Fairy Tales"? **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.13, n. 4, p. 615-650, 2000.

LACAVA, Z. G. M. **Análise citogenética relacionada a idade e ao tratamento com drogas em macrófagos peritoneais e células da medula óssea de camundongos fêmeas Swiss hiperimunes intactos ou ooforectomizados**. Brasília, 1991. 138 f. Tese (Doutorado em Fisiologia) - Universidade de Brasília.

LEO, M. A.; LIEBER, C. S. Alcohol and vitamin A. **Alcohol World, Health & Research**, Washington, v. 13, n. 3, p. 250-254, 1989.

LESTER, D.; BUCCINS, R.; BIZZOCO, D. The vitamin C status of alcoholics. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 70, p. 278-282, 1960.

LIEBER, C. S. Alcohol and nutrition: an overview. **Alcohol World, Health & Research**, Washington, v. 13, n. 3, p. 197-203, 1989.

LIM, C.; KLESIOUS, P. H.; DUNCAN, P. L. Immune response and resistance of channel catfish to *Edwardsiella ictaluri* challenge when fed various dietary levels of zinc methionine and zinc sulfate. **J. Aquat. Anim. Health**, Bethesda, v. 8, n. 4, p. 302-307, 1996.

MARSANO, L., McCLAIN, C. J. Effects of alcohol on electrolytes and minerals. **Alcohol World, Health & Research**, Washington, v. 13, n. 3, p. 255, 1989.

MELLO AIRES, M. de. **Fisiologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 132.

NICASTRI, A. L. Nephrotoxicity of bence-jones proteins: correlation with endocytosis by BHK cells and intracellular movement. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Ribeirão Preto, v. 44, n. 2, p.165-171, 2001.

NILSSON, E. et al. *In vitro* effects of ethanol on polymorphonuclear leucocyte membrane receptor expression and mobility. **Biochemical Pharmacology**, New York, v. 51, p. 225-231, 1996.

OLSON, R. E. et al. Zinc deficiency impairs ethanol metabolism. **Nutr. Rev.**, Washington, n. 43, p. 158-159, 1985.

PAPADIMITRIOU, J. M.; ASHMAN, R. B. Macrophages: current views on their differentiation, structure and function. **Ultrastruct. Path.**, London, v. 13, p. 343-372, 1989.

PARHAM, P. **The immune system**. London: Garland, 2000. p. 1-9.

PAULING, L. **Como viver mais e melhor**. São Paulo: Best Seller, 1988. p. 152.

- PIEMONTE, M. R. Alterações estruturais em macrófagos peritoneais de camundongos tratados com o Método Canova. Curitiba, 1999. 63 f. Dissertação (Mestrado em Morfologia - Biologia Celular) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- PYNE, S.; PYNE, N. J. Sphingosine 1-phosphate signalling in mammalian cells. **Biochem. J.**, London, v. 349, p. 385-402, 2000.
- QURESHI, M. A. Role of macrophages in avian health and disease. **Poultry-Science**, Savoy, v. 77, p. 978-982, 1998.
- RHODES, J.; OLIVER, S. Retinoids as regulators of macrophage function. **Immunology**, Oxford, v. 40, p. 467-472, 1980.
- ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, J. **Imunologia**. 5. ed. São Paulo: Manole, 1999. p. 1-3, 132, 156.
- RUSSEL, D. G. A comparison of the parasitophorous vacuoles occupied by Leishmania and Mycobacterium. **Trends Cell Biology**, Limerick, v. 5, p. 125-128, 1995.
- RUTZKY, L. P.; PUMPER, R. W. Supplement to a survey of commercially available tissue culture media. **In Vitro**. Largo, v. 9, p. 468, 1970.
- SCHLESINGER, L. et al. Zinc supplementation impairs monocyte function. **Acta Paediatr.**, Oslo, v. 82, p. 734-738, 1993.
- SCHUTZE, S. et al. Tumor necrosis factor signal transduction: tissue-specific serine phosphorylation of a 26 KdA cytosolic protein. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 264, p. 3562-3527, 1989.
- SEMBA, R. D. The role of vitamin A and related retinoids in immune function. **Nutrition Reviews**, Washington, v. 56, n. 1, S38-S48, 1998.
- SHANKAR, A. H.; ANANDA, S. P. Zinc and immune function: the biological basis of altered resistance to infection. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v. 68(suppl), p. 447-463S, 1998.
- SHERR, C. J. Regulation of mono nuclear phagocyte proliferation by colony-stimulating factor-1. **Int. J. Cell Cloning**, Dayton, v. 8 (Suppl. 1), p. 46-62, 1990.
- SKACEL, P. O.; CHANARIN, I. Impaired chemiluminescence and bactericidal killing by neutrophils from patients with severe cobalamin deficiency. **British Journal of Haematology**, Oxford, v. 55, p. 203-215, 1983.
- STAHL, P. D. et al. Evidencie for receptor-mediated binding of glycoproteins, glycoconjugates and lysosomal glycosidases by alveolar macrophages. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Washington, v. 75, p. 1399-1403, 1978.
- STEIN, M.; KESHAV, S. The versatility of macrophages. **Clin. Exp. Allergy**, Oxford, v. 22, p. 19-27, 1992.
- SZABO, G. Consequences of alcohol consumption on host defence. **Alcohol and Alcoholism**, Oxford, v. 34, p. 830-841, 1999.
- SWANSON, J. A.; BERTHIAUME, E. P.; MEDINA, C. Molecular size-fractionation during endocytosis in macrophages. **J. Cell Biol.**, New York, v. 129, p. 989-998, 1995.

- THOMASKUTTY, K. G., LEE, C. M. Interaction of nutrition and infection: macrophage activity in vitamin B12 – deficient rats infected with *Trypanosoma lewisi*. **Journal of the National Medical Association**, Thorofare, v. 79, n. 4, p. 441-446, 1987.
- THORNER, R. E.; BARKER, C. F.; MACGREGOR, R. R. Improvement of granulocyte adherence and in vivo granulocyte delivery by ascorbic acid in renal transplant patients. **Transplantation**, Baltimore, v. 35, n. 5, p. 432-436, 1983.
- TIETSE, C.; SCHLESINGER, P.; STHAL, P. D. Mannose-specific endocytosis receptor of alveolar macrophages: demonstration of two functionally distinct intracellular pools of receptor and their roles in receptor recycling. **J. Cell. Biol.**, New York, v. 92, p. 417-424, 1982.
- TORMEY, V. J. et al. T-cell cytokines may control the balance of functionally distinct macrophage populations. **Immunology**, Oxford, v. 90, p. 463- 469, 1997.
- VICTOR, V. V. et al. Ascorbic acid modulates *in vitro* the function of macrophages from mice with endotoxic shock. **Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 46, p. 89-101, 2000.
- VIEIRA, E. C. et al. **Química fisiológica**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1995. p. 287.
- VILEMAN, T. E.; LENNARTZ, M. R.; STAHL, P. D. Identification of the macrophage mannose receptor as a 175-kDa membrane protein. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Washington, v. 83, p. 2501-2505, 1986.
- WARR, G. A. A macrophage receptor for (mannose/glucosamine) glycoproteins of potential importance in phagocytic activity. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Orlando, v. 93, n. 3, p. 737-745, 1980.
- WATSON, R. R. et al. Changes in lymphocyte subsets and macrophage functions from high, short-term dietary ethanol in C57/BL6 mice. **Life Sciences**, New York, v. 43, p. 865-870, 1988.
- WEINFELD, I., BIRMAN, E. G., PAULA, C. R. Macrophage phagocytosis of *Candida albicans*: an *in vitro* study. **Rev. Odontol. Univ. São Paulo**, v. 13, n. 3, p. 233-238, 1999.
- WIRTH, J. J.; FRAKER, P. J.; KIERSZENBAUM, F. Changes in the levels of marker by mononuclear phagocytes in zinc deficient mice. **J. Nutr.**, Bethesda, v. 114, p. 1826-1833, 1984.
- WIRTH, J. J.; FRAKER, P. J.; KIERSZENBAUM, F. Zinc requirement for macrophage function: effect of zinc deficiency on uptake and killing of a protozoa parasite. **Immunology**, Oxford, v. 68, n. 1, p. 114-119, 1989.
- XU, H. et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 exerts opposing effects to IL-4 on MHC class- II antigen expression, accessory activity, and phagocytosis of human monocytes. **Scand. J. Immunol.**, New York, v. 38, p. 535-540, 1993.

## APÊNDICES

APÊNDICE 1 - DULBECCO'S MODIFIED EAGLE'S MEDIUM (DMEM) .....	111
APÊNDICE 2 - FÓRMULAS DE MEIOS DE CULTURA QUE CONTÊM OS MICRONUTRIENTES DESTE PROJETO.....	112
APÊNDICE 3 - DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA .....	113

## APÊNDICE 1 - DULBECCO'S MODIFIED EAGLE'S MEDIUM (DMEM)

COMPONENTES	D 6655 g / L
<b>SAIS INÓRGANICOS:</b>	
Cloreto de Cálcio.2H <sub>2</sub> O	0,265
Nitrato Férrico. 9H <sub>2</sub> O	0,0001
Sulfato de Magnésio	0,09767
Cloreto de Potássio	0,4
Bicarbonato de Sódio	—
Cloreto de Sódio	6,4
Fosfato de Sódio Monobásico	0,109
<b>AMINOÁCIDOS:</b>	
L-Arginina.HCl	0,084
L-Cistina.2HCl	0,0626
L-Glutamina	0,584
Glicina	0,030
L-Histidina.HCl.H <sub>2</sub> O	0,042
L-Isoleucina	0,105
L-Leucina	0,105
L-Lisina.HCl	0,146
L-Metionina	0,030
L-Fenilalanina	0,066
L-Serina	0,042
L-Treonina	0,095
L-Triptofano	0,016
L-Tirosina.2Na.2H <sub>2</sub> O	0,10379
L-Valina	0,094
<b>VITAMINAS:</b>	
Colina	0,004
Ácido Fólico	0,004
Inositol	0,0072
Niacinamida	0,004
D-Ácido Pantotênico (hemicálcio)	0,004
Piridoxal.HCl	0,004
Piridoxina.HCl	—
Riboflavina	0,0004
Tiamina.HCl	0,004
<b>OUTROS:</b>	
D-Glucose	4,5
Vermelho de Fenol.Na	0,0159
<b>ADJ:</b>	
Bicarbonato de Sódio	3,7
<b>ESPECIFICAÇÕES:</b>	
pH em temperatura ambiente (sem bicarbonato de sódio)	6,3 ± 0,3
pH em temperatura ambiente (com bicarbonato de sódio)	7,8 ± 0,3
Osmolalidade – mOsm / Kg H <sub>2</sub> O (sem bicarbonato de sódio)	260 ± 5%
Osmolalidade – mOsm / Kg H <sub>2</sub> O (com bicarbonato de sódio)	335 ± 5%
Gramas de pó requerido para preparar 1 l	13,4

FONTE: DULBECCO; FREEMAN (1959, p. 396-397); SMITH et al. (1960, p. 185-196);  
MORTON (1970, p. 89); RUTZKY; PUMPER (1974, p. 468).

APÊNDICE 2 - FÓRMULAS DE MEIOS DE CULTURA QUE CONTÊM OS MICRONUTRIENTES DESTA PROJETO

g/L	Ascorbic Acid. Na (Vit. C)	Vitamin B - 12	Zinc Sulfate . 7H <sub>2</sub> O	Calciferol Vitamina D	Retinol Acetate
Ames' Med. A 1420	0,01796				
BGjb Medium B6644	0,05	0,00004			
CMRL-1066 Medium C0422	0,05				
CRCM-30 Med. C 5030		0,0003			
DME – Ham's Nutrient Mix F- 12 D6905		0,00068	0,000432		
F-12 Coon's Modif. F6636	0.15 (s/ Na) L- Asc. Ac.	0,00136	0,000863		
DME/NCTC 109 H9014	0,00625	0,00125		0,00003125	0,00003125
Medium 199 M 5017	0,0000566			0,0001	0,00014
NCTC Media N 5138 (135)	0,05 (s/ Na) L- Asc. Acid	0,01		0,00025	0,00025
Williams' Med. E W 4128	0,00227	0,0002	0,0000002	0,0001	0,0001

FONTE: \* Tabela extraída de: SIGMA Cell Culture - 1995 Catalogue & Price List - Fórmulas. St. Louis. MO, USA. p. 234-308.

## APÊNDICE 3 - DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA

As fotografias foram realizadas no microscópio invertido - LEICA DM IL, do laboratório de cultivo celular do Departamento de Biologia Celular, da UFPR.

FIGURA 1 - MACRÓFAGOS. COLORAÇÃO DE GIEMSA. 400X

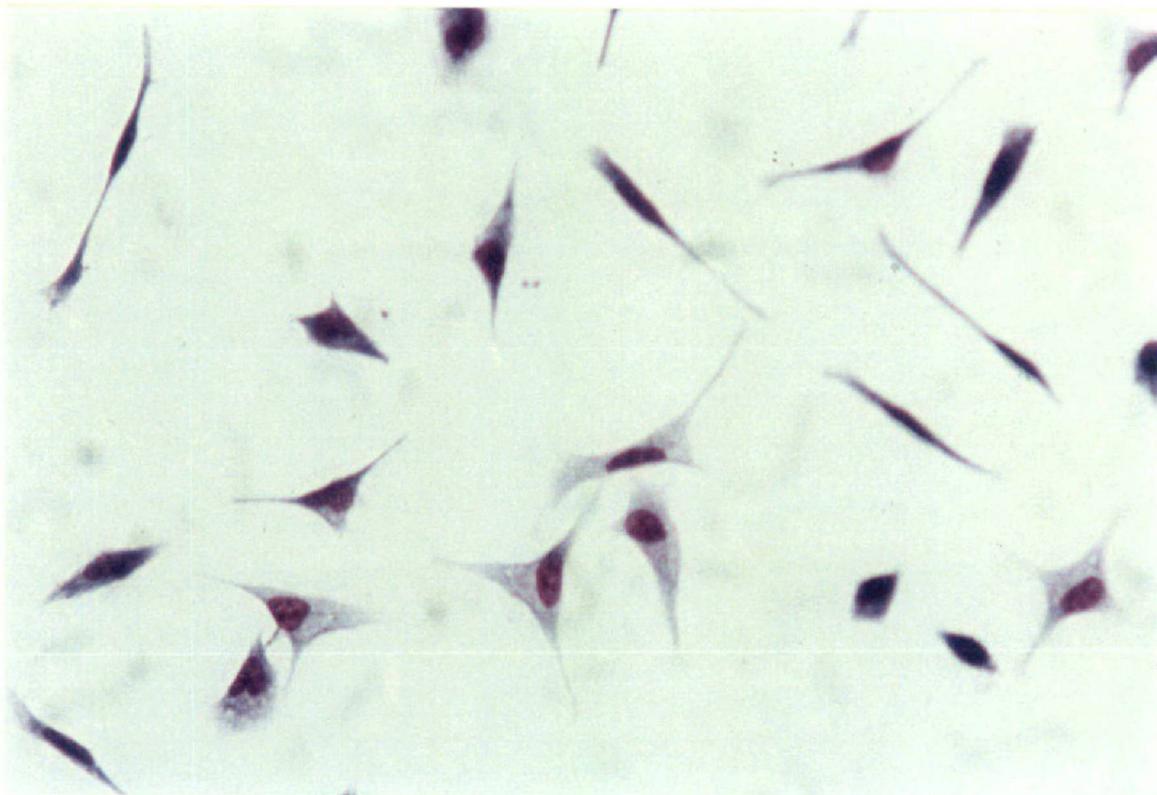


FIGURA 2 - MACRÓFAGOS APÓS INCUBAÇÃO COM A LEVEDURA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*.  
COLORAÇÃO DE GIEMSA. 400X

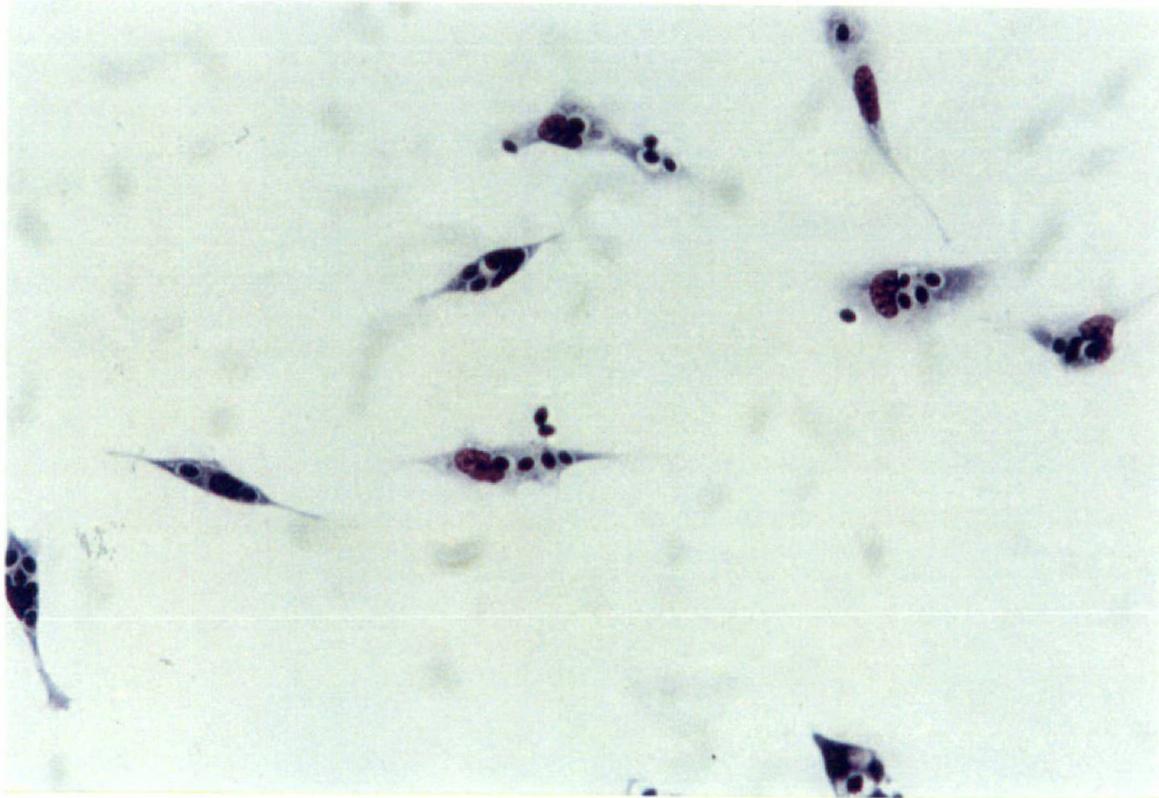


FIGURA 3 - MACRÓFAGOS EXPOSTOS AO ETANOL E INCUBADOS COM A LEVEDURA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* EM PLACA DE CULTURA. 400X

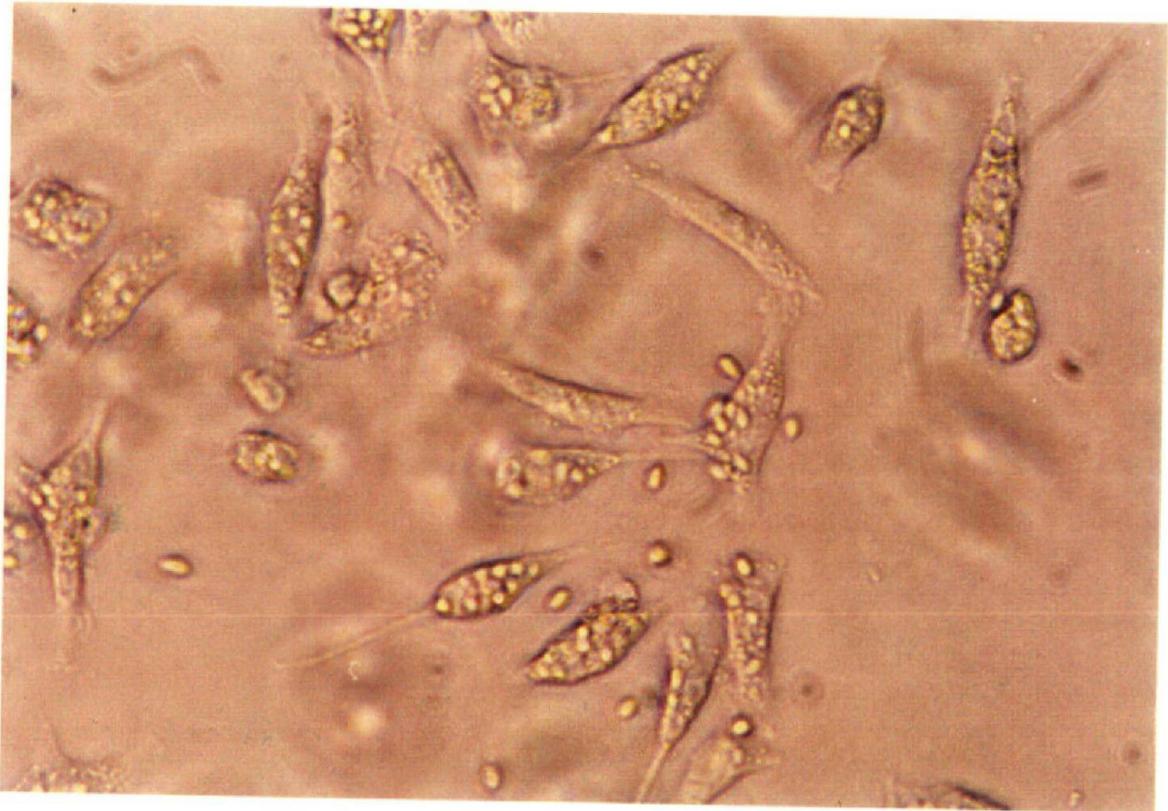


FIGURA 4 - MACRÓFAGOS EXPOSTOS AO ETANOL E INCUBADOS COM A LEVEDURA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*. COLORAÇÃO DE GIEMSA. 200X

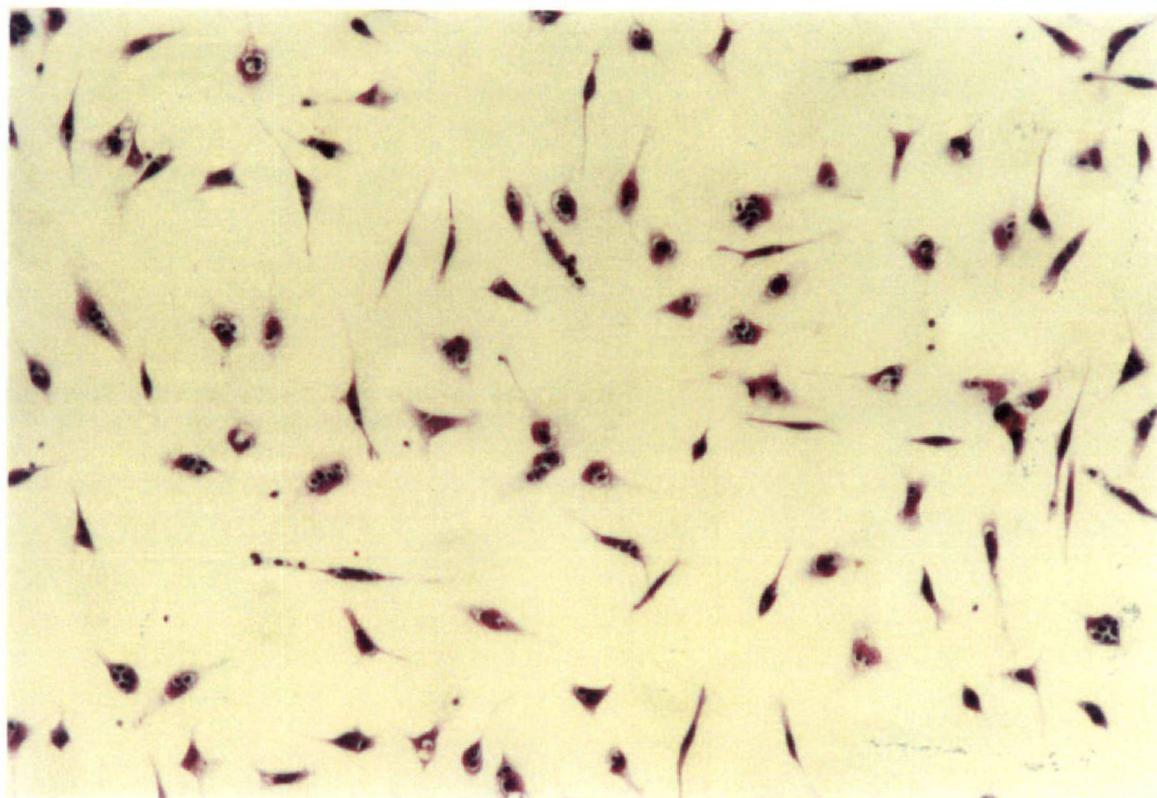


FIGURA 5 - MACRÓFAGOS EXPOSTOS AO ETANOL E INCUBADOS COM A LEVEDURA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*. COLORAÇÃO DE GIEMSA. 400X

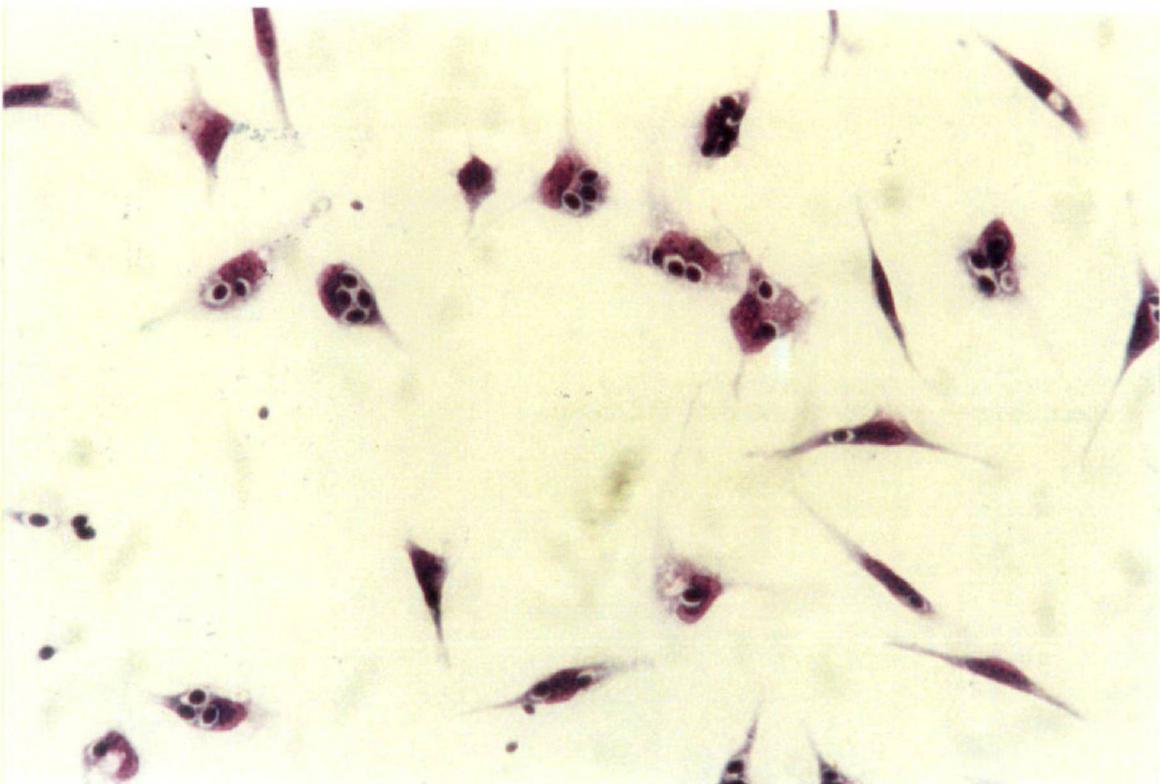
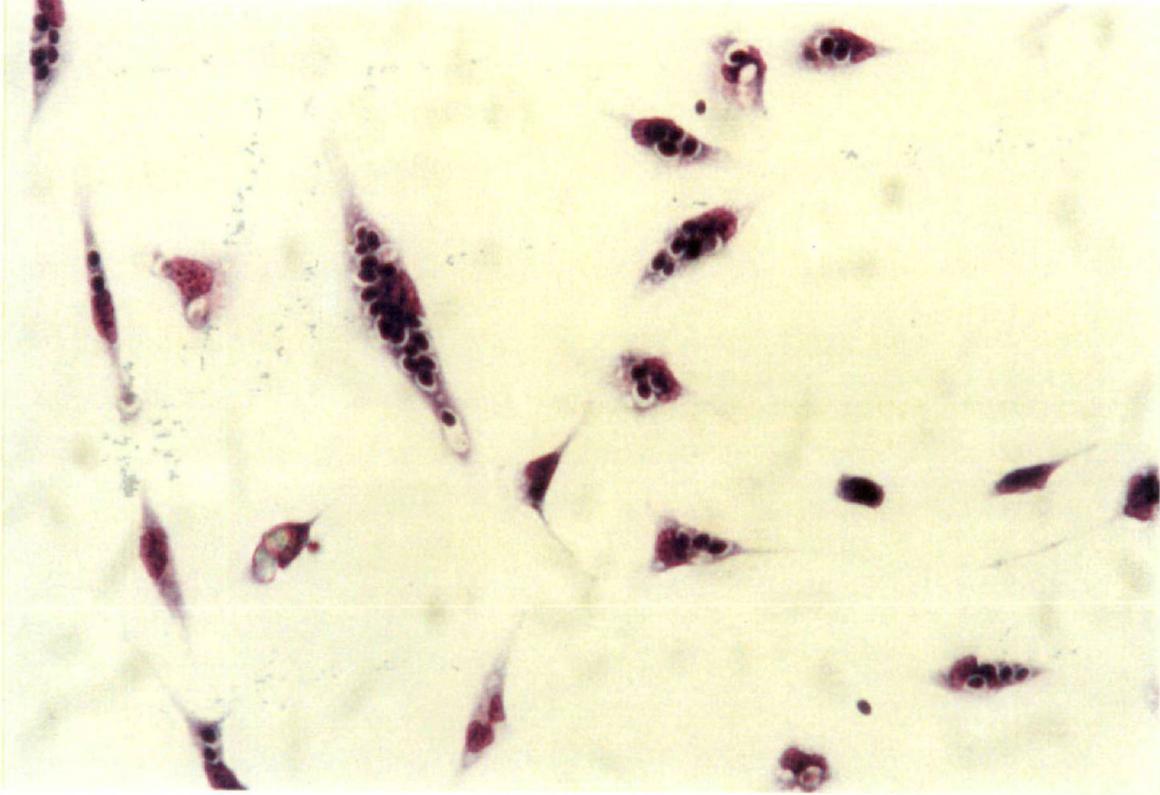


FIGURA 6 - MACRÓFAGOS EXPOSTOS À VITAMINA A E INCUBADOS COM A LEVEDURA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*. COLORAÇÃO DE GIEMSA. 400X

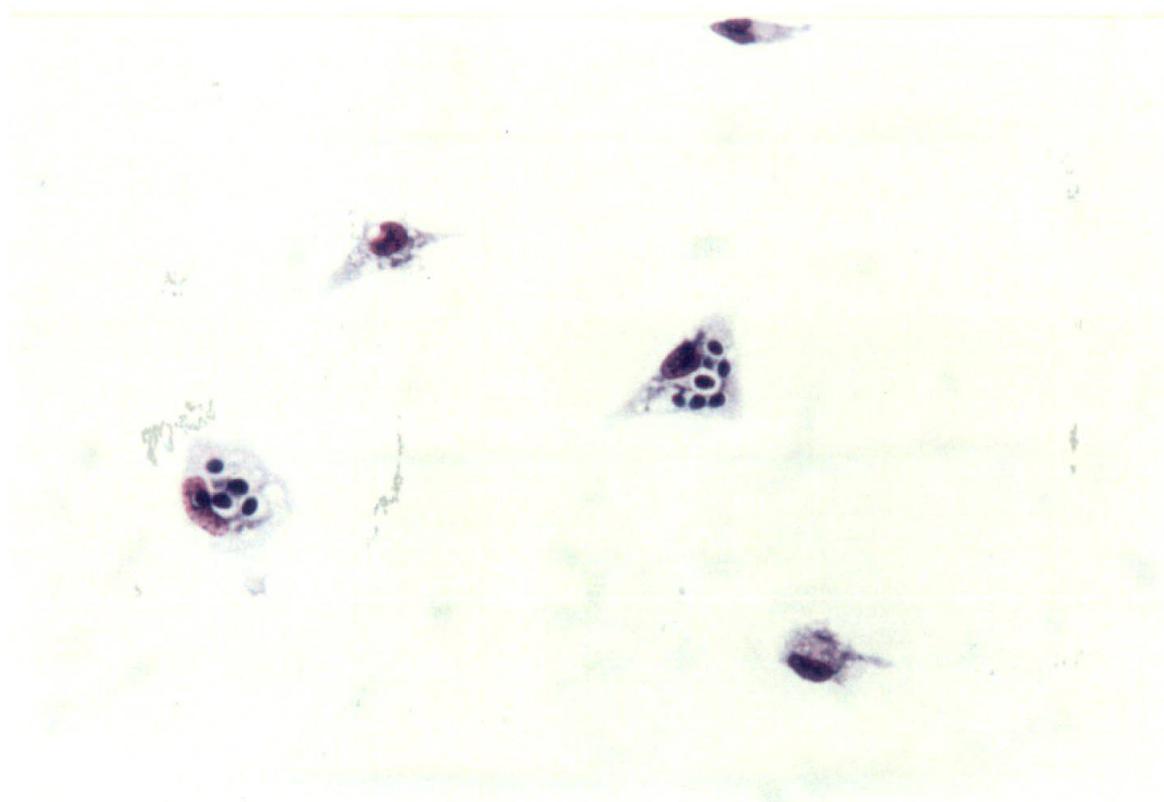


FIGURA 7 - MACRÓFAGOS EXPOSTOS À VITAMINA B12 E INCUBADOS COM A LEVEDURA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*. COLORAÇÃO DE GIEMSA. 400X

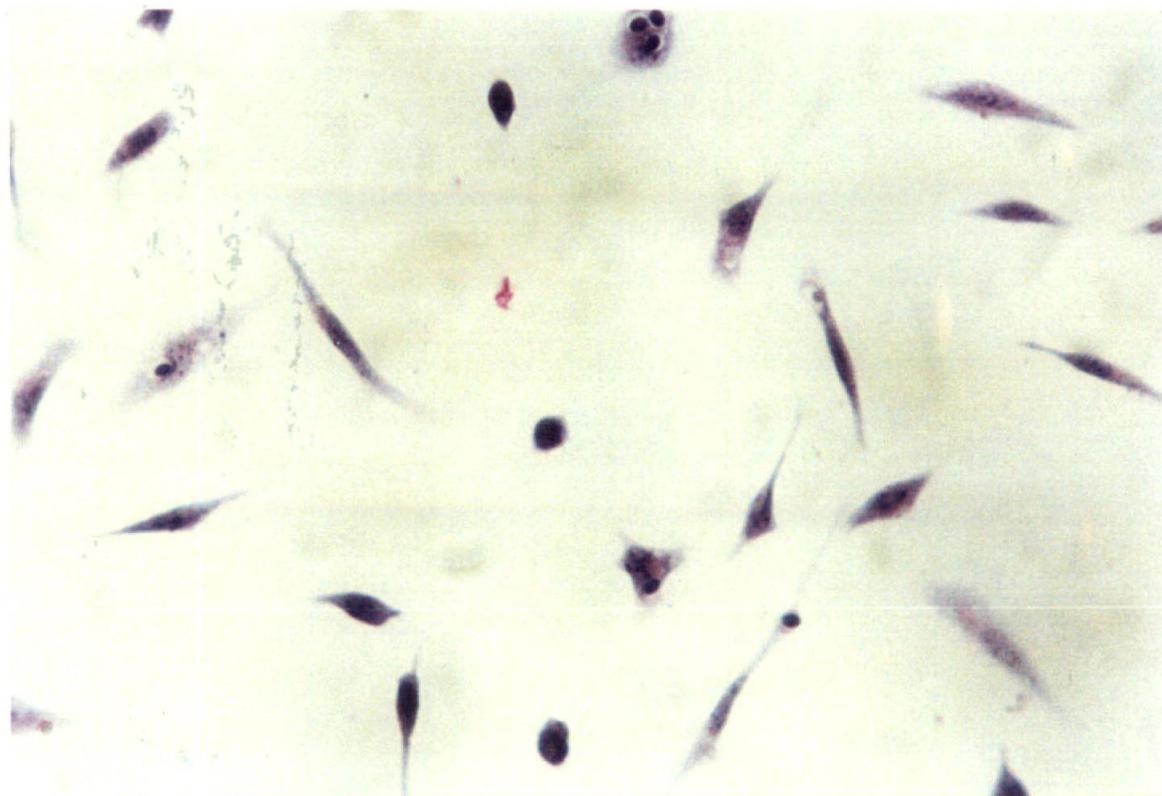


FIGURA 8 - MACRÓFAGOS EXPOSTOS À VITAMINA C E INCUBADOS COM A LEVEDURA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*. COLORAÇÃO DE GIEMSA. 400X

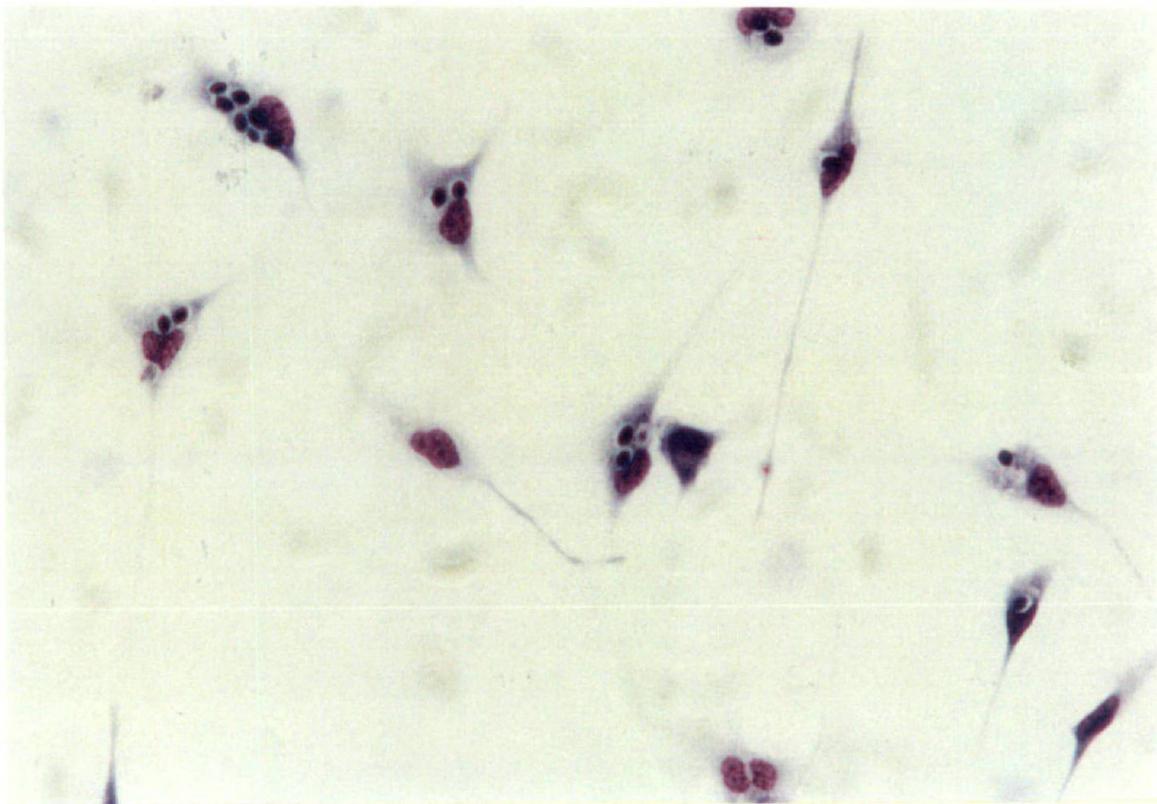


FIGURA 9 - MACRÓFAGOS EXPOSTOS À VITAMINA D3 E INCUBADOS COM A LEVEDURA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*. COLORAÇÃO DE GIEMSA. 400X

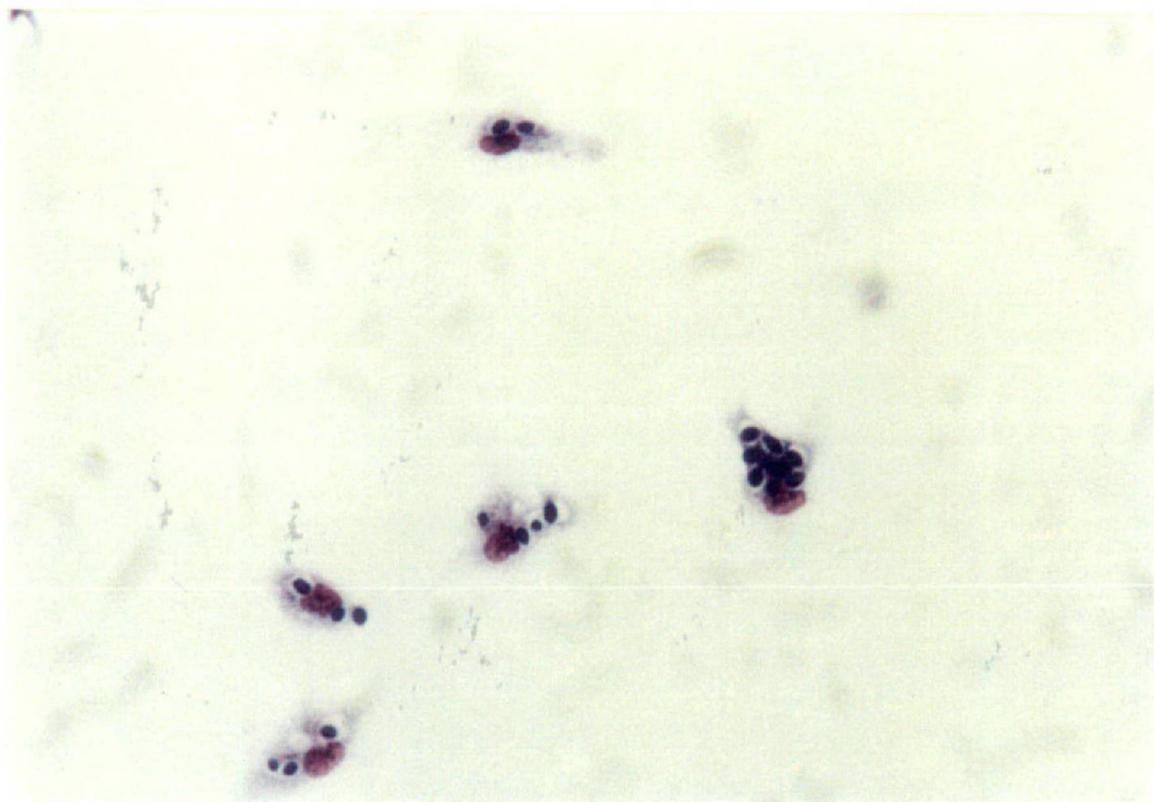


FIGURA 10 - MACRÓFAGOS EXPOSTOS AO ZINCO E INCUBADOS COM A LEVEDURA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*. COLORAÇÃO DE GIEMSA. 400X



FIGURA 11 - MACRÓFAGOS EXPOSTOS AO ETANOL E VITAMINA A, E POSTERIORMENTE INCUBADOS COM A LEVEDURA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*. COLORAÇÃO DE GIEMSA. 400X

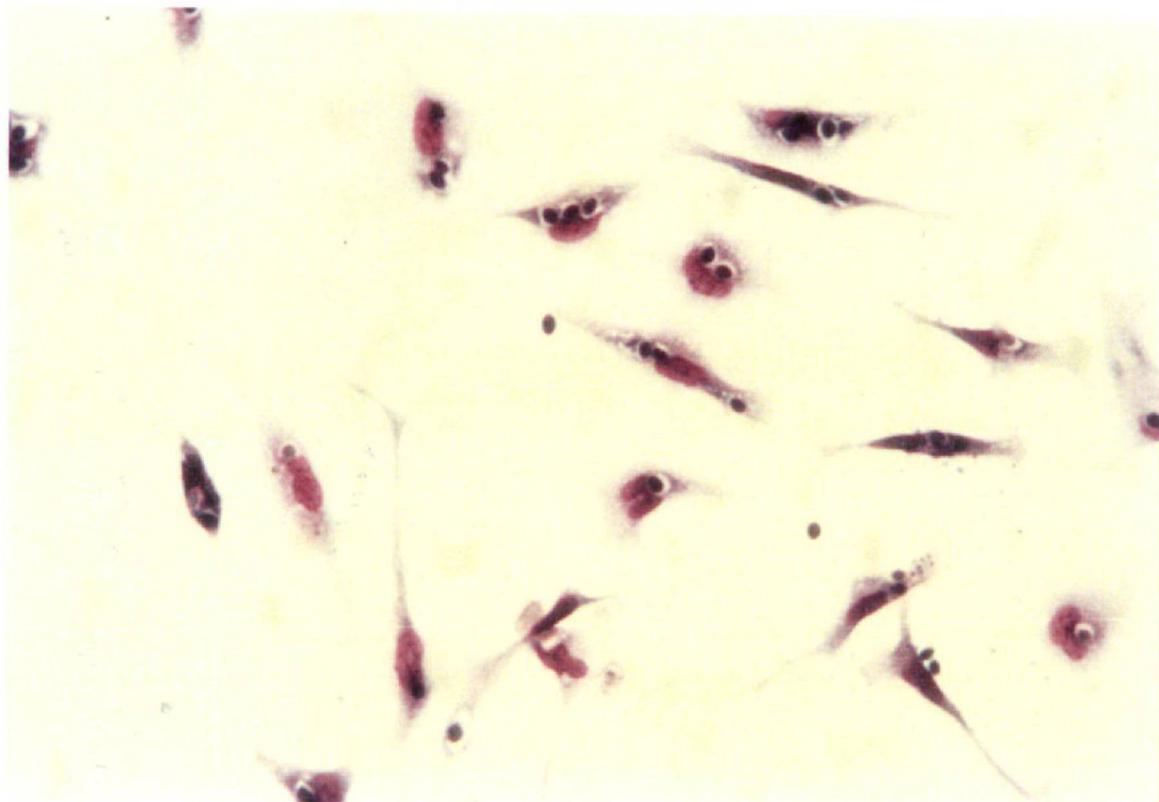


FIGURA 12 - MACRÓFAGOS EXPOSTOS AO ETANOL E VITAMINA B12, E POSTERIORMENTE INCUBADOS COM A LEVEDURA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*. COLORAÇÃO DE GIEMSA. 400X

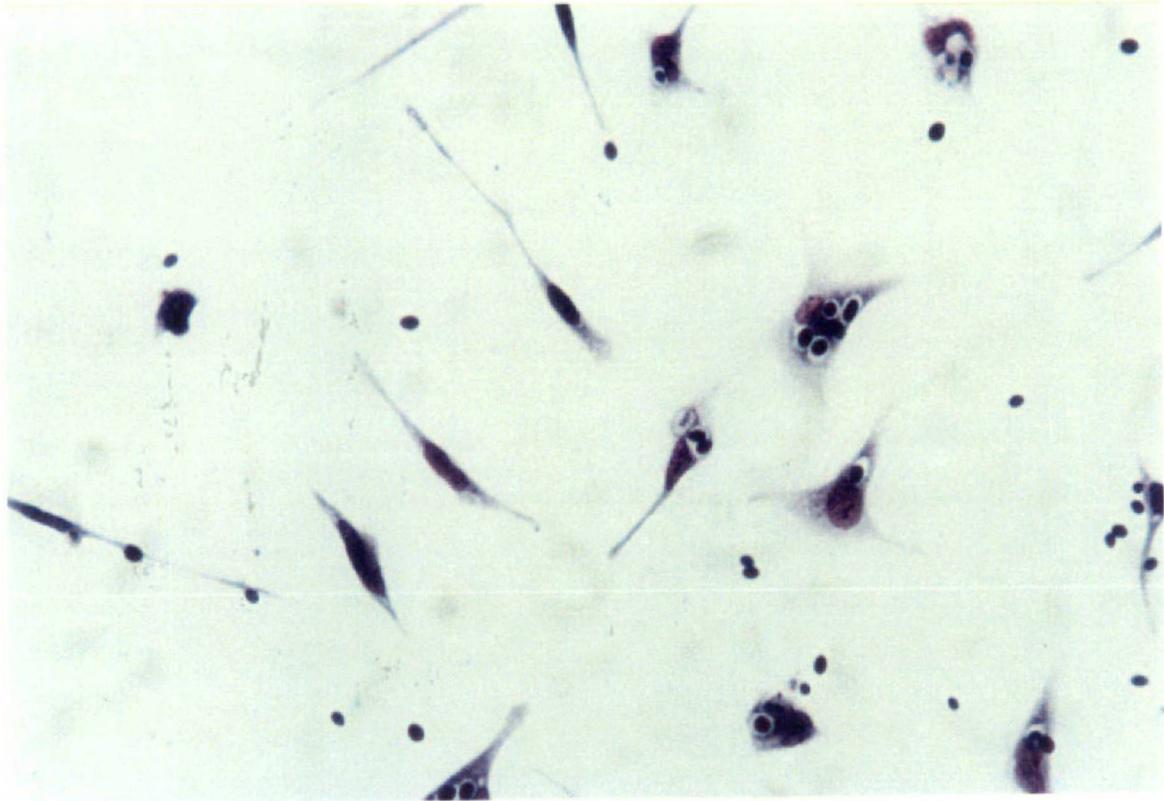


FIGURA 13 - MACRÓFAGOS EXPOSTOS AO ETANOL E VITAMINA C, E POSTERIORMENTE INCUBADOS COM A LEVEDURA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*. COLORAÇÃO DE GIEMSA. 400X

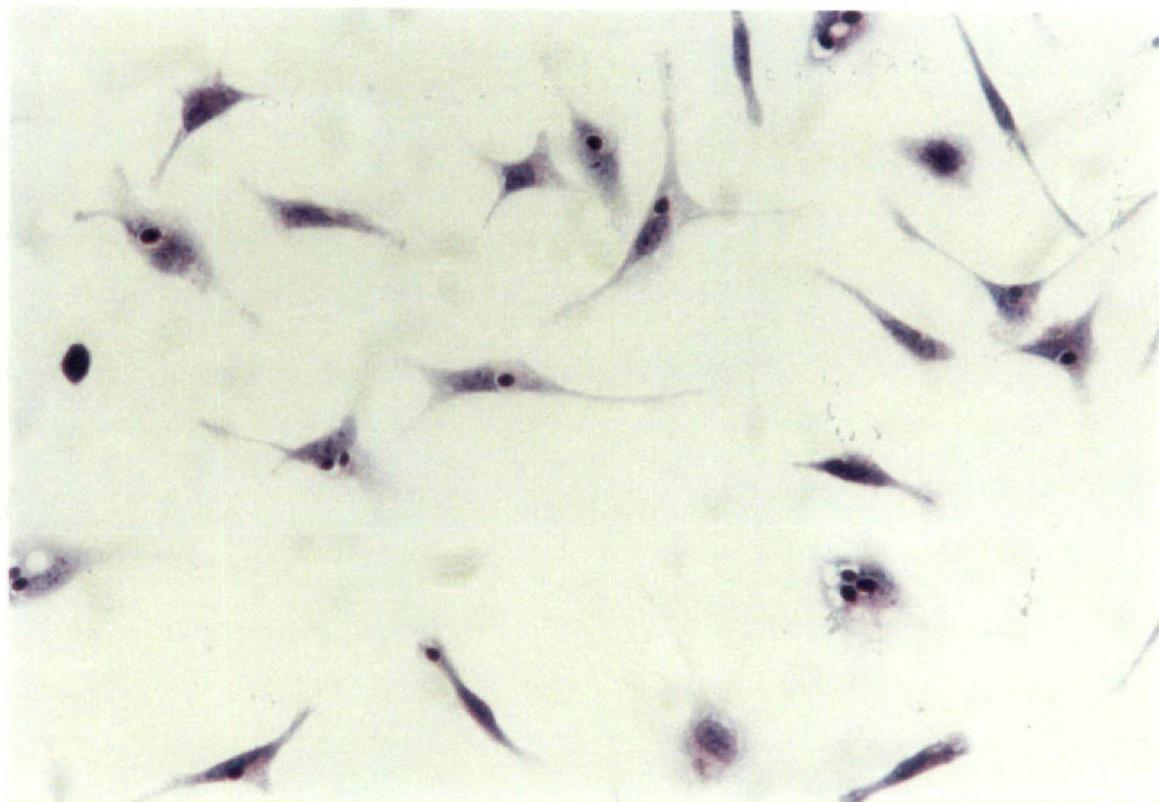


FIGURA 14 - MACRÓFAGOS EXPOSTOS AO ETANOL E VITAMINA D3, E POSTERIORMENTE INCUBADOS COM A LEVEDURA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*. COLORAÇÃO DE GIEMSA. 400X

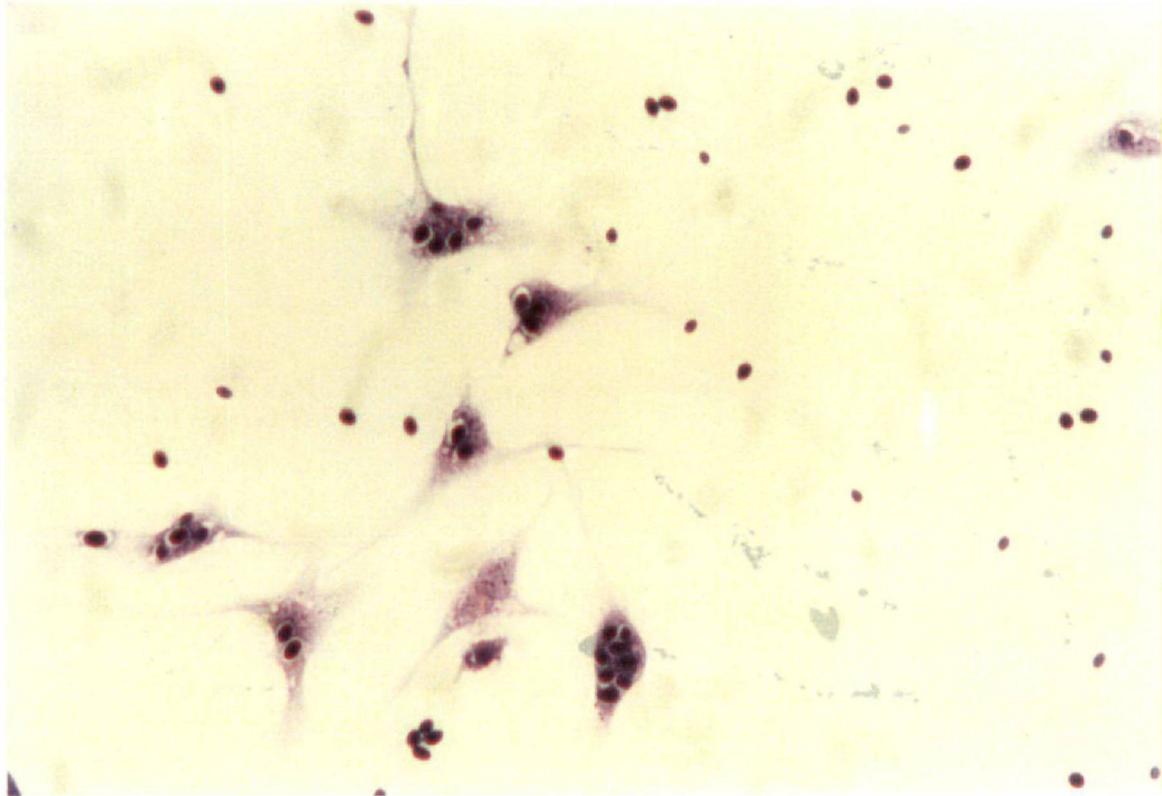


FIGURA 15 - MACRÓFAGOS EXPOSTOS AO ETANOL E ZINCO, E POSTERIORMENTE INCUBADOS COM A LEVEDURA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*. COLORAÇÃO DE GIEMSA. 400X

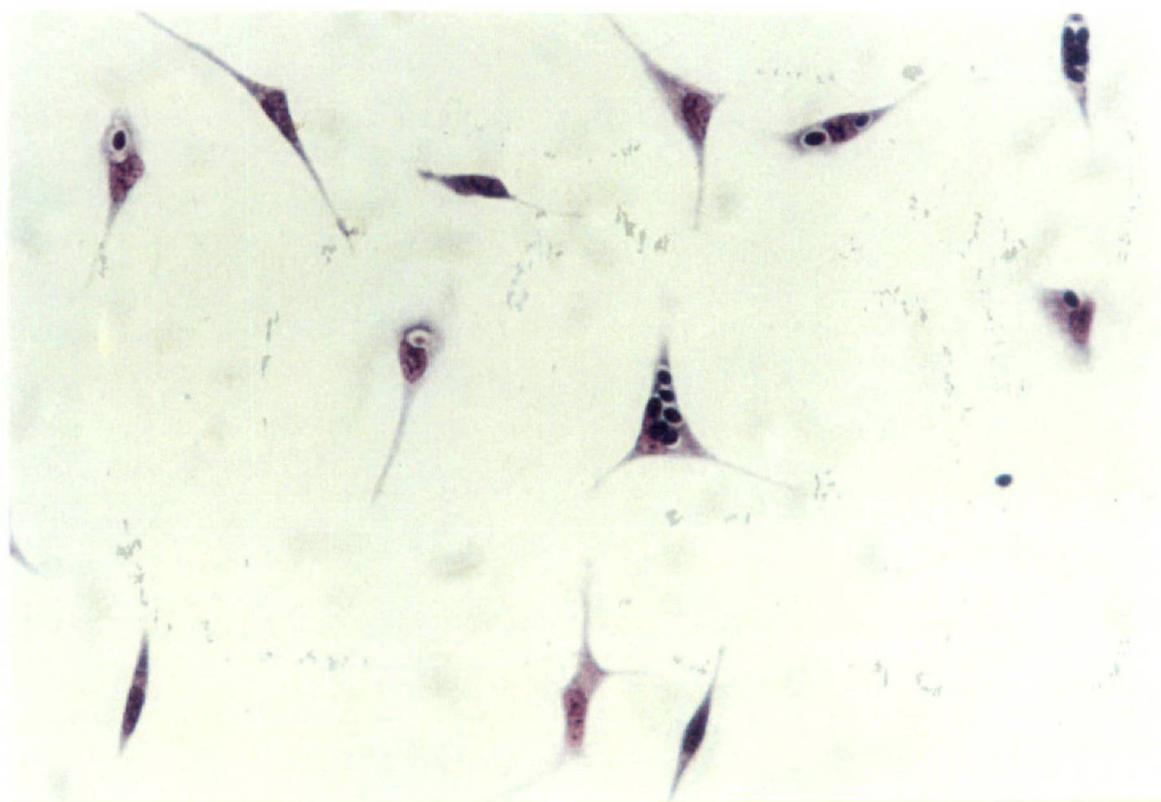


FIGURA 16 - MACRÓFAGOS EXPOSTOS AO ETANOL E ZINCO, E POSTERIORMENTE INCUBADOS COM A LEVEDURA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* EM PLACA DE CULTURA. 400X

