



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Aline Aparecida da Rosa

Alterações no tecido esplênico e perfil da resposta imunológica de camundongos esquistossomóticos submetidos à ingestão de etanol

Rio de Janeiro

2019

Aline Aparecida da Rosa

**Alterações no tecido esplênico e perfil da resposta imunológica de camundongos
esquistossomóticos submetidos à ingestão de etanol**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra. Renata Heisler Neves

Coorientadora: Dra. Luciana Brandão Bezerra

Rio de Janeiro

2019

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

R788 Rosa, Aline Aparecida da.
Alterações no tecido esplênico e perfil da resposta imunológica de camundongos esquistossomóticos submetidos à ingestão de etanol / Aline Aparecida da Rosa. – 2019.
79 f.

Orientadora: Renata Heisler Neves.
Coorientadora: Luciana Brandão Bezerra.

Mestrado (Dissertação) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental.

1. Esquistossomose mansônica - Teses. 2. Esquistossomose mansoni. 3. Etanol- Teses. 4. Baço – Imunologia- Teses. 5. Citocinas – Teses. I. Neves, Renata Heisler. II. Bezerra, Luciana Brandão. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Humana e Experimental. IV. Título.

CDU 616.995.122

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira
CRB/7 - 6382

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Aline Aparecida da Rosa

**Alterações no tecido esplênico e perfil da resposta imunológica de camundongos
esquistossomóticos submetidos à ingestão de etanol**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-
Graduação em Biologia Humana e Experimental, da
Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 26 de fevereiro de 2019.

Coorientadora: Dra. Luciana Brandão Bezerra

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Renata Heisler Neves (Orientadora)

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof.^a Dra. Thaís Porto Amadeu

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof. Dr. Alexandre dos Santos Pyrrho

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2019

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente à minha mãe Jonice, que apesar do curtíssimo tempo que tivemos juntas, se mantém sempre no meu coração. E à minha tão amada avó Catarina, o ser humano mais maravilhoso com quem tive o prazer de viver.

Dedico também, a todos aqueles que amam e se dedicam a ciência. Aqueles que geram e transmitem qualquer tipo de conhecimento, inspirando novas atitudes e transformando vidas.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela minha saúde e por guardar a mim e aos meus entes queridos.

Ao meu marido, essencial em minha vida, simplesmente por viver ao meu lado, essa vitória é nossa.

Aos meus amados familiares que, mesmo na distância, me dão apoio para superar as dificuldades, e incentivo para buscar sempre o melhor. Me fazem sorrir enquanto penso neles.

À minha querida orientadora, que sempre tem uma solução simples e prática, para problemas que parecem impossíveis de se resolver. Obrigada por todo apoio, e palavras de incentivo, você é um exemplo de professora e pesquisadora.

Agradeço também, a coorientadora deste trabalho por toda ajuda prestada desde a parte experimental até a correção da parte escrita.

Aos meus maravilhosos amigos do laboratório, (grupo Pós- Helminto) que alegram meus dias e dão apoio quando o “desespero” bate à porta. Eu amo vocês!

A todos os professores que, desde a minha infância, são fonte de admiração e inspiração. Me pergunto: o que seria do mundo sem vocês? Agradeço imensamente a dedicação de cada um a profissão, graças a vocês, a ciência segue resistindo.

Aos demais técnicos e colegas de laboratório e do departamento, por todo o auxílio nestes experimentos. Tem um pedacinho de cada um de vocês neste trabalho. O meu obrigada por toda ajuda, vocês são essenciais, assim como os professores, na vida dos alunos.

A Capes pela concessão da bolsa de fomento, responsável pela minha dedicação exclusiva a este trabalho e as disciplinas.

Por fim, minha gratidão a todos que contribuíram direta ou indiretamente para que eu tenha concluído este trabalho.

Desejo que mesmo diante das dificuldades, sigamos em frente pelo amor. O amor e a educação transformam.

A educação é a arma mais poderosa que você pode usar para mudar o mundo.

Nelson Mandela

RESUMO

ROSA, Aline Aparecida da. **Alterações no tecido esplênico e perfil da resposta imunológica de camundongos esquistossomóticos submetidos à ingestão de etanol.** 2019.79f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

Na infecção esquistossomótica mansônica, o baço é um dos órgãos afetados, causando o aumento do seu volume (esplenomegalia). A ingestão de etanol através de bebidas alcoólicas pode causar atrofia do baço e interferir na atividade imunológica. Para se ter conhecimento desta associação sobre o baço e no perfil de resposta imunológica, foram utilizados camundongos machos como modelo experimental. Um grupo desses animais (n=5) não foram infectados e nem receberam etanol (Grupo C), outro grupo (n=5) não foi infectado, porém recebeu por via oral (gavagem), 200 µL/dia/animal de etanol à 18%, durante 28 dias consecutivos (Grupo CE). Os demais animais foram infectados com 80 cercarias (Cepa BH) de *S. mansoni*, sendo um grupo (n=7) mantido apenas a infecção (Grupo I), e no outro grupo (n=7) foi administrado o etanol (28 dias consecutivos) iniciando-se na quinta semana de infecção indo até o final do experimento (Grupo IE). Na nona semana de infecção, ao término da gavagem, todos os animais foram eutanasiados e o conteúdo do lavado peritoneal (em meio RPMI) foi recolhido para a obtenção de citocinas produzidas por células peritoneais. O baço foi retirado, clivado longitudinalmente em duas partes. Uma destas partes foi fixada e submetida a processamento histológico de rotina e os cortes histológicos corados em H&E e Reticulina de Gomori. O outro fragmento foi macerado (em fluxo laminar) e a suspensão de células, após o ajuste de concentração de células (2×10^6), foi plaqueada para obtenção de citocinas produzidas por células do baço. Análises bioquímicas e sanguíneas (leucograma) também foram realizadas. As alterações no baço foram avaliadas através das análises histopatológica e estereológica (sistema de teste D36), morfometria de polpa branca e quantificação de megacariócitos. As citocinas produzidas por células do peritoneais e do baço foram dosadas por citometria de fluxo (*Citometric Bead Array*). Os resultados das análises bioquímicas mostraram aumento significativo da glicose (+ 71%; p=0,0079), do colesterol (+ 22%; p= 0,0079), do HDL (+ 27%; p= 0,0079) e da albumina (+ 30%; p= 0,0079) no grupo IE em relação ao grupo I. As análises no tecido esplênico do grupo IE mostraram aumento na quantidade de trabéculas e de megacariócitos, diminuição das fibras reticulares, bem como alterações organizacionais na polpa branca e polpa vermelha. A citocina IL-6 produzida pelas células peritoneais apresentou aumento significativo (+32200; p=0,0018) no grupo IE, quando comparado ao grupo C. As alterações encontradas neste estudo demonstram que a ingestão de etanol interfere em alguns parâmetros da infecção esquistossomótica experimental, como as alterações no tecido esplênico e no padrão da produção das citocinas.

Palavras-chave: Esquistossomose mansônica. Etanol. Baço. Resposta Imunológica. Citocinas.

ABSTRACT

ROSA, Aline Aparecida da. **Changes in splenic tissue and immune response profile of schistosomiasis-infected mice submitted to ethanol intake.** 2019. 79 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

In schistosomiasis mansoni infection, the spleen is one of the affected organs, causing the increase of its volume (splenomegaly). Ingestion of ethanol through alcoholic beverages can cause spleen atrophy and interfere with immune activity. To gain insight of this association on the spleen and in the immunological response profile, male mice were used as the experimental model. One group of these animals (n = 5) were neither infected nor received ethanol (Group C), another group (n = 5) was not infected, but received orally (gavage) 200 μ L / day of ethanol 18% for 28 consecutive days (CE Group). The remaining animals were infected with 80 cercariae (BH strain) of *S. mansoni*, with one group (n = 7) being maintained the infection only (Group I), and in the other group (n = 7) was administered ethanol (28 consecutive days) beginning on the fifth week of infection, going to the end of the experiment (IE group). At the ninth week of infection, at the end of the gavage, all animals were euthanized and the content of the peritoneal lavage (in RPMI medium) was collected to obtain cytokines produced by peritoneal cells. The spleen was removed, cleaved longitudinally into two parts. One of these parts was fixed and submitted to routine histological processing and histological sections stained in H&E and Gomori reticulin. The other fragment was macerated (in laminar flow) and the cell suspension, after adjustment of cell concentration (2×10^6), was plated to obtain cytokines produced by lymphocytes. Biochemical and blood analyzes (leukogram) were also performed. Spleen alterations were evaluated through histopathological and stereological analysis (test system D36), white pulp morphometry and megakaryocyte quantification. Cytokines produced by peritoneal cells and lymphocytes were measured by flow cytometry (*Citometric Bead Array*). The results of the biochemical analysis showed a significant increase of glucose (+ 71%; p=0.0079), cholesterol (+ 22%; p= 0.0079), HDL (+ 27%; p= 0.0079) and albumin (+ 30%; p= 0.0079) in the IE group in relation to group I. The analyzes in the splenic tissue of the IE group showed an increase in the amount of trabeculae and megakaryocytes, decrease in reticular fibers, as well as organizational changes in white pulp and red pulp. The IL-6 cytokine produced by the peritoneal cells presented a significant increase (+32200; p = 0.0018) in the IE group when compared to the C group. Changes in this study demonstrate that ethanol ingestion interferes in some experimental parameters of schistosome infection, such as changes in spleen tissue and in the pattern of cytokine production.

Keywords: Schistosomiasis mansoni. Ethanol. Spleen. Immune response. Cytokines.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Mapa de distribuição da esquistossomose no Brasil.....	17
Figura 2 –	Vermes adultos acasalados de <i>Schistosoma mansoni</i> corados por carmin clorídrico.....	18
Figura 3 –	Ciclo biológico do <i>Schistosoma mansoni</i>	20
Figura 4 –	Granuloma esquistossomótico no tecido esplênico.....	22
Figura 5 –	Balanco da produção de citocinas Th1 e Th2 e Treg em infecção primária por <i>S.mansoni</i> em camundongos.....	25
Figura 6 –	Desenho experimental.....	32
Quadro 1–	Grupos experimentais.....	32
Quadro 2–	Protocolo do corante hematológico Panótico.....	33
Figura 7 –	Técnica utilizada para a leitura da distensão sanguínea pelo método de Ameia modificado.....	34
Quadro 3–	Testes bioquímicos.....	35
Figura 8 –	Grade contendo 36 cruces utilizada no método estereológico D36.....	39
Figura 9 –	Níveis de glicose de camundongos infectados ou não e submetidos à ingestão de etanol 18% ou não, durante 28 dias consecutivos.....	42
Figura 10 –	Fotomicrografia do tecido esplênico de camundongos não infectados, grupo C.....	47
Figura 11 –	Fotomicrografia do tecido esplênico de camundongos não infectados e submetidos à ingestão de etanol por 28 dias - grupo CE.	47
Figura 12 –	Fotomicrografia do tecido esplênico de camundongos infectados pelo <i>S mansoni</i> - grupo I.....	48
Figura 13 –	Fotomicrografia do tecido esplênico de camundongos infectados pelo <i>S mansoni</i> e submetidos a ingestão de etanol 18% por 28 dias consecutivos, grupo IE.....	49
Figura 14 –	Fotomicrografia do tecido esplênico de camundongos infectados e submetidos à ingestão de etanol, ou não, por 28 dias consecutivos.....	50
Figura 15 –	Área (μm^2) da polpa branca do tecido esplênico de camundongos infectados e submetidos ou não à ingestão de etanol por 28 dias consecutivos.....	52

Figura 16 –	Perímetro (μm) da polpa branca do tecido esplênico de camundongos infectados e submetidos ou não à ingestão de etanol por 28 dias consecutivos.....	52
Figura 17 –	Quantificação de megacariócitos encontrados na polpa vermelha do tecido esplênico.....	53
Figura 18 –	Citocinas TNF, IFN- γ , IL-6 e quimiocina MCP-1 (pg/mL) produzidas por células peritoneais de camundongos infectados e submetidos à ingestão de etanol à 18% ou não, durante 28 dias consecutivos	55
Figura 19 –	Citocinas IL-10, IL-17A, TNF, IFN- γ (pg/mL) produzidas por linfócitos do tecido esplênico de camundongos infectados e submetidos à ingestão de etanol à 18% ou não, durante 28 dias consecutivos.....	58
Figura 20 –	Citocinas IL-6, IL-4 e IL-2 (pg/mL) produzidas por linfócitos do tecido esplênico de camundongos infectados e submetidos à ingestão de etanol à 18% ou não, durante 28 dias consecutivos.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Etapas do processamento histológico, coloração e montagem de lâminas do baço.....	37
Tabela 2 –	Colorações utilizadas nos cortes do tecido esplênico.....	38
Tabela 3 –	Massa corporal, do baço e massa relativa do baço (expresso em gramas) de camundongos infectados ou não e submetidos à ingestão de etanol à 18% ou não, durante 28 dias consecutivo.....	41
Tabela 4 –	Lipidograma de camundongos infectados ou não e submetidos à ingestão de etanol 18% ou não, durante 28 dias consecutivos.....	43
Tabela 5 –	Hepatograma de camundongos infectados ou não e submetidos à ingestão de etanol 18% ou não, durante 28 dias consecutivos.....	44
Tabela 6 –	Leucograma de camundongos esquistossomóticos ou não e submetidos ou não, a ingestão de etanol a 18%, durante 28 dias consecutivos.....	45
Tabela 7 –	Densidade do volume (%) do tecido esplênico de camundongos infectados ou não e submetidos à ingestão de etanol à 18% ou não, durante 28 dias consecutivos.....	51
Tabela 8 –	Dosagem de citocinas (pg/mL) produzidas por células peritoneais de camundongos infectados e submetidos à ingestão de etanol à 18% ou não, durante 28 dias consecutivos.....	54
Tabela 9 –	Dosagem de citocinas (pg/mL) produzidas por linfócitos do tecido esplênico de camundongos infectados e submetidos à ingestão de etanol à 18% ou não, durante 28 dias consecutivos.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACK	Do inglês, <i>Ammonium-Chloride-Potassium</i>
CEUA	Comissão de ética no Uso de Animais
DHA	Doença Hepática Alcoólica
D36	Técnica estereológica constituído por uma grade contendo 36 pontos testes
HDL	Lipoproteína de alta densidade, do inglês <i>High Density Lipoprotein</i>
HTLV-1	Vírus T-linfotrópico humano tipo 1
IFN - γ	Interferon Gama
IgE	Imunoglobulina da classe E
IgG	Imunoglobulina da classe G
IL-	Interleucina
INPEG	Inquérito Nacional da Prevalência da Esquistossomose mansoni e Geohelminthoses
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade, do inglês <i>Low Density Lipoprotein</i>
MCP-1	Proteína de Quimioatração de Monócitos
OMS	Organização Mundial de Saúde
PALS	Bainha de periarteriolar de linfócitos
POC-CCA	Do inglês, <i>point-of-care circulating cathodic antigen</i>
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio, do inglês <i>Reactive Oxygen Species</i>
RPM	Rotações por minuto
RPMI	Meio de cultura de células <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
STAT 6	Do inglês, <i>Signal Transducer and Activator of Transcription 6</i>
TGF- β	Fator de Transformação do Crescimento beta do inglês, <i>Transforming Growth Factor beta</i>
TGO/AST	Transaminase Glutâmico Oxalacética / Aspartato Aminotransferase
TGP/ALT	Transaminase Glutâmico Pirúvica / Alanina Aminotransferase
Th	<i>T helper</i>
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa, do inglês, <i>Tumor Necrosis Factor alpha</i>
Treg	T Regulatório
VLDL	Lipoproteínas de Muito Baixa Densidade, do inglês, <i>Very Low Density Lipoprotein</i>

γ -GT
^{99m}TC

Gamaglutamiltranspeptidase
Tecnécio sestamibi

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
±	Mais ou menos
dL	Decilitro
mL	Mililitro
cm ²	Centímetro quadrado
μL	Microlitro
μm	Micrometro
pH	Medida do nível de acidez ou basicidade
CO ₂	Dióxido de Carbono
U/L	Unidade por litro
mg	Micrograma
h	Hora
X	Vezes
Vv	Densidade de Volume
μm ²	Micrometro quadrado
≤	Menor ou igual
pg	Picograma
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
Cm	Centímetros
Min	Minutos
°C	Grau Celsius

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	16
1	OBJETIVOS	30
1.1	Geral	30
1.2	Específicos	30
2	MATERIAL E MÉTODOS	30
2.1	Animais	31
2.2	Comitê de Ética	31
2.3	Infecção experimental	31
2.4	Administração do etanol	31
2.5	Grupos experimentais	32
2.6	Biometria dos animais	33
2.7	Distensão sanguínea	33
2.8	Leucograma	33
2.9	Necropsia	34
2.10	Dosagens Bioquímicas	34
2.11	Obtenção das células peritoneais para dosagem de citocinas	35
2.12	Isolamento dos linfócitos para dosagem de citocinas	36
2.13	Processamento histológico e coloração das lâminas	36
2.14	Análise histopatológica	38
2.15	Estereologia e Morfometria	38
2.16	Quantificação de Megacariócitos	39
2.17	Análise Estatística	39
3	RESULTADOS	41
3.1	Biometria do animais e massa relativa do órgão	41
3.1.1	<u>Massa dos animais</u>	41
3.1.2	<u>Massa do órgão</u>	41
3.1.3	<u>Relação Massa do órgão/ massa do animal</u>	41
3.2	Dosagens Bioquímicas	42
3.2.1	<u>Glicose</u>	42
3.2.2	<u>Lipidograma</u>	42
3.2.3	<u>Hepatograma</u>	43

3.3	Leucograma	44
3.3.1	<u>Bastão</u>	44
3.3.2	<u>Neutrófilo</u>	44
3.3.3	<u>Linfócitos e Monócitos</u>	44
3.3.4	<u>Eosinófilos</u>	44
3.4	Histopatologia	45
3.5	Estereologia pelo método D36	51
3.6	Morfometria de polpa branca	51
3.6.1	<u>Área</u>	51
3.6.2	<u>Perímetro</u>	51
3.7	Quantificação de Megacariócitos	53
3.8	Dosagem de citocinas produzidas pelas células peritoneais	53
3.8.1	<u>TNF</u>	53
3.8.2	<u>IFN- γ</u>	53
3.8.3	<u>MCP-1</u>	54
3.8.4	<u>IL-6</u>	54
3.9	Dosagem de citocinas produzidas por linfócitos	55
3.9.1	<u>IL-10</u>	55
3.9.2	<u>IL-17 A</u>	56
3.9.3	<u>IFN-γ</u>	56
3.9.4	<u>TNF</u>	56
3.9.5	<u>IL-4</u>	56
3.9.6	<u>L-6</u>	56
3.9.7	<u>IL-2</u>	56
4	DISCUSSÃO	60
	CONCLUSÕES	68
	REFERÊNCIAS	69

INTRODUÇÃO

Aspectos epidemiológicos da esquistossomose

A esquistossomose é considerada uma das doenças tropicais mais importantes no mundo. Estima-se que pelo menos 249 milhões de pessoas estejam infectadas em cerca de 78 países (LEITE et al., 2016). No Brasil, a esquistossomose é causada pelo trematódeo digenético *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907, e é uma das doenças que configuram o quadro de prioridades no Plano Integrado de Ações Estratégicas de Eliminação de Doenças Negligenciadas (BRASIL, 2013).

Cerca de 20 milhões de pessoas vivem em áreas com risco de contrair a doença no país, no qual as áreas endêmicas da doença abrangem ao todo 19 estados, principalmente na região nordeste e sudeste (MARTINS-MELO et al., 2015). Embora o recente Inquérito Nacional da Prevalência da Esquistossomose mansoni e Geo-helmintoses tenha apontado um decréscimo na positividade da esquistossomose, que passou de 9,24% em 1977 para 1,79% atualmente, a doença ainda representa um grande problema de saúde pública, principalmente por se tratar de uma doença negligenciada que está diretamente relacionada à pobreza (KATZ, 2018) (Figura 1).

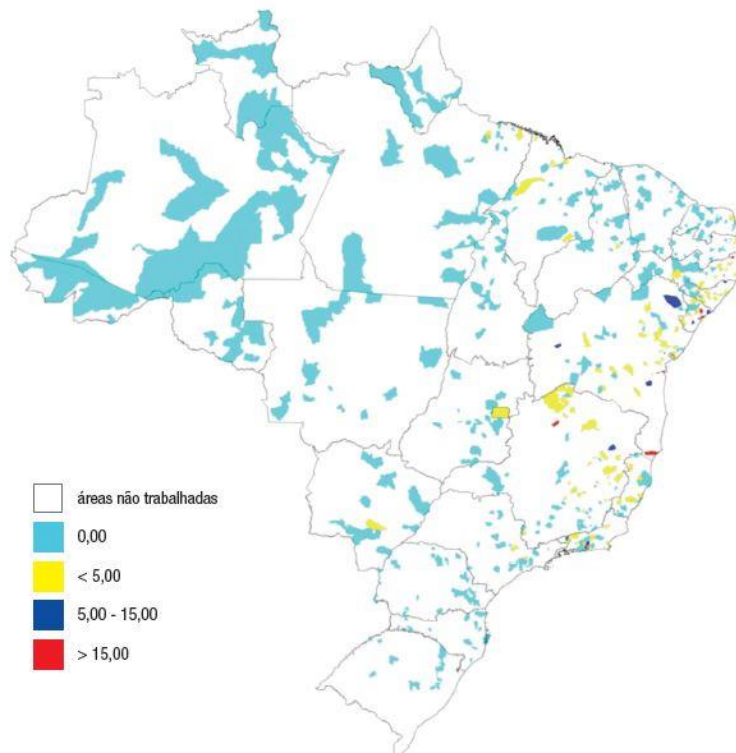
A permanência da esquistossomose mansônica no país, está ligada a fatores preponderantes como: renda familiar, nível de escolaridade, acesso a informação e condições de saneamento básico. Nas áreas endêmicas da doença, inúmeras fontes de água utilizadas para fins domésticos ou de recreação, são consideradas de alto risco de transmissão, e cabe ressaltar, que o risco de contrair a infecção nesses locais não é eventual, já que os moradores dependem dessas fontes hídricas. Além deste fato, mesmo as áreas indenes, podem apresentar condições favoráveis para novos focos de transmissão, devido a fatores ambientais (ocorrência do hospedeiro intermediário) e sociais (condições econômicas, de saneamento e abastecimento de água precários) (BRASIL, 2014; DRUMMOND, 2014). Somente no ano de 2016, cerca de 4900 casos, incluindo as formas graves da doença, foram confirmados em áreas não endêmicas do país, mostrando a importância de políticas de prevenção e controle desta parasitose pelos gestores da saúde pública no Brasil (BRASIL, 2017).

Os sintomas da esquistossomose podem variar devido a fatores como: exposição prévia ao parasito, carga parasitaria e reatividade do hospedeiro (BINA; PRATA, 2003). Frequentemente, habitantes de áreas endêmicas e que estão constantemente em contato com

os antígenos do parasito, apresentam poucos sintomas (BINA; PRATA, 2003), dificultando o diagnóstico.

A técnica de Kato-Katz (KATZ; CHAVES; PELLEGRINO, 1972) é considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS), o padrão-ouro para detecção da esquistossomose, devido ao seu baixo custo, sua fácil manipulação, e por ser um método quantitativo. No entanto, alguns autores (KONGS et al., 2001; GRENFELL et al., 2013) não a consideram como a mais eficaz para identificar pessoas com baixa carga parasitária. Diante deste fato, outras técnicas estão sendo estudadas e aprimoradas, como o método do gradiente salino (COELHO et al., 2009), Helmintex® (TEIXEIRA et al., 2007), técnicas moleculares (ENK; OLIVEIRA E SILVA; RODRIGUES, 2012; INÁCIA GOMES et al., 2010) e o teste imunológico denominado de POC-CCA (COLLEY et al., 2013; VAN DAM et al., 2004), que apresentaram resultados promissores para utilização em áreas de baixa carga parasitária. O POC-CCA detecta antígenos circulantes através da urina com alta sensibilidade e especificidade. Seu formato laboratorial, como teste de tira, permite diagnosticar a infecção em campo. Em um recente estudo realizado em área endêmica (baixa carga parasitária), mostrou que a positividade com o teste POC-CCA foi significativamente maior do que os resultados obtidos através do método Kato Katz (BEZERRA et al., 2018).

Figura 1 - Mapa de distribuição da esquistossomose no Brasil



O parasito e o seu ciclo biológico

O *S. mansoni* é um trematódeo, que contrariando a generalidade da sua classe, apresenta sexos separados, com dimorfismo sexual (KASTNER et al., 1975; NEVES et al., 2004) (Figura 2).

Figura 2 - Vermes adultos acasalados de *Schistosoma mansoni* corados por carmim clorídrico



Fonte: MACHADO E SILVA; NEVES; GOMES, 2008.

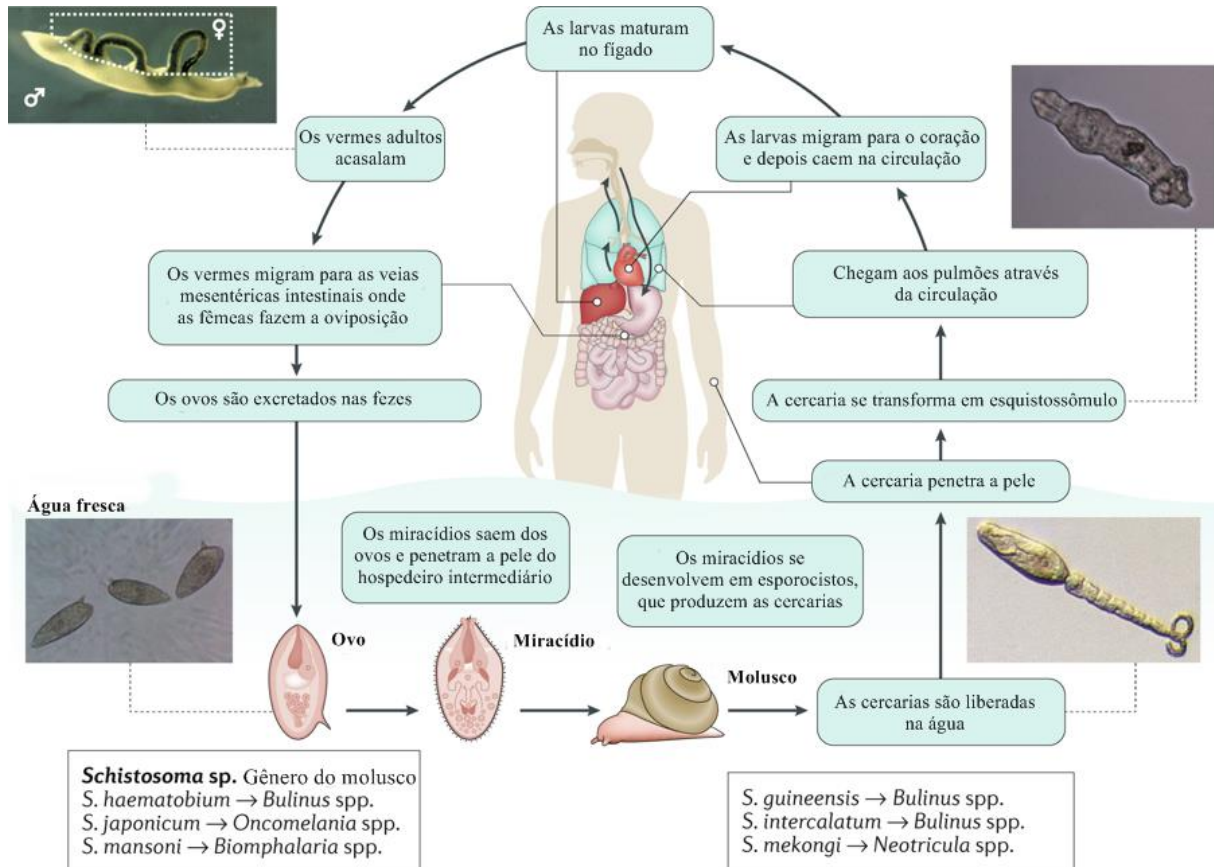
A espécie foi introduzida no Brasil devido ao tráfico de escravos infectados, oriundos do continente africano entre o século XVI e XVII (KATZ, 2018). Muitos deles, também estavam infectados pelo *Schistosoma haematobium* Bilharz, 1852, no entanto, só a primeira espécie se manteve e perpetuou, devido à presença dos hospedeiros intermediários, que são moluscos de água doce do gênero *Biomphalaria*, amplamente difundidos no país. Ao todo 3 espécies destes moluscos são suscetíveis ao *S. mansoni*: *B. glabrata* Say, 1818, *B. straminea* Dunker, 1848 e *B. tenagophila* Orbigny, 1835 (MARCHIORI, 1999).

O ciclo biológico do *S. mansoni* se inicia quando o hospedeiro vertebrado (alguns mamíferos como o homem) infectado, libera ovos viáveis junto as fezes que, em contato com a água doce, se rompem e permitem a saída da forma larvária ciliada, denominada miracídio. Estes, penetram no caramujo (hospedeiro intermediário), onde se multiplicam, tornando-se

cercarias (forma infectante do hospedeiro vertebrado) (SIMÕES et al., 2017). As cercarias, após 4 a 6 semanas, começam a sair do caramujo pelas partes moles em grande número. Em contato com coleções d'água contaminadas, o hospedeiro vertebrado é infectado pelas cercarias que penetram através da pele. Em seguida, as cercarias perdem a cauda, transformando-se em esquistossômulos, que caem na circulação sanguínea e migram por ela, passando pelo coração e pulmão, até chegarem no sistema porta hepático, onde as formas jovens amadurecem sexualmente (macho e fêmea) e acasalam-se. Após o acasalamento, os helmintos adultos deslocam-se contra a corrente sanguínea para as veias mesentéricas, onde a fêmea inicia a postura de ovos. Alguns destes ovos atravessam a parede do intestino, sendo liberados junto com as fezes, reiniciando o ciclo biológico (LAMBERTUCCI, 2010; MCMANUS et al., 2018). No entanto, muitos ovos são arrastados pelo fluxo sanguíneo e acabam retidos nos capilares de órgãos (Figura 3) como o fígado, principalmente (ALENCAR et al., 2016).

Os danos diretos causados pela presença dos vermes adultos no hospedeiro são mínimos, no entanto, os ovos retidos nos tecidos, iniciam uma intensa resposta inflamatória granulomatosa (BICA; HAMER; STADECKER, 2000). Os ovos secretam um antígeno solúvel, responsável pelo desencadeamento de um complexo fisiopatológico reacional, que promove a formação do granuloma (LINS et al., 2008). Esta liberação de antígeno, a partir dos ovos, induz a mobilização de macrófagos, eosinófilos, linfócitos e plasmócitos, seguido da produção de fibras de colágeno que envolvem toda a lesão (LENZI et al., 1998; SOUZA et al., 2011). Durante seu desenvolvimento, os granulomas esquistossomóticos possuem diferentes estágios de maturação, apresentando desde as formas iniciais com predominância celular, aos estágios cicatriciais com grande quantidade de colágeno (LENZI et al., 1998).

Figura 3 – Ciclo biológico do *Schistosoma mansoni*



Fonte: MCMANUS *et al.*, 2018. Adaptado.

O baço e as alterações esplênicas durante a esquistossomose

Maciço e alongado, o baço possui coloração vermelho-escuro à azul- arroxeado e está situado à esquerda na cavidade abdominal, logo abaixo do diafragma e atrás do estômago. Este órgão, possui participação na circulação porta, no sistema imunológico e é o maior órgão linfático secundário do organismo. Suas funções incluem filtrar todas as partículas estranhas da corrente sanguínea pela fagocitose, participação na resposta imune contra antígenos provenientes do sangue, produção e destruição de células hematológicas, além de ser um local de armazenamento de hemácias e plaquetas (MEBIUS; KRAAL, 2005).

O interior do baço é composto por dois compartimentos com funções e morfologia que se diferem: a polpa vermelha e a polpa branca. Externamente, é revestido por uma cápsula composta de tecido fibroso denso, fibras elásticas e músculo liso. Esta cápsula emite trabéculas para o parênquima esplênico, que são estruturas irregulares de músculo liso e de

tecido fibroelástico. Essas trabéculas, também possuem vasos sanguíneos, vasos linfáticos eferentes, pelos quais os linfócitos migram para os linfonodos esplênicos, além de nervos. As artérias e veias esplênicas adentram ao órgão através do hilo (CESTA, 2006).

A polpa vermelha é composta por uma rede tridimensional de cordões esplênicos e seios venosos. Estes cordões, são compostos por fibras reticulares (colágeno tipo III) e macrófagos associados (SAITO et al., 1988), que funcionam como um filtro que retira material estranho e hemácias danificadas, bem como, um local de armazenamento de ferro, hemácias e plaquetas. Em roedores, é um sítio de hematopoiese, particularmente em animais fetais e neonatais (NOLTE et al., 2002; BALOGH; HORVÁTH; SZAKAL, 2004).

A polpa branca é um agregado de células linfóides que circundam as artérias esplênicas. Esta estrutura é subdividida em três zonas: (1) a bainha linfóide periarteriolar (PALS) – composta por linfócitos T em maturação; (2) os folículos linfóides – se formam a partir de expansões em alguns pontos da PALS, para um dos lados das artérias, formando nódulos compostos, principalmente, por linfócitos B; (3) a zona marginal – região interface entre a polpa branca e a polpa vermelha apresentando grande concentração de linfócitos, macrófagos e células dendríticas. As funções da polpa branca, incluem a fagocitose de antígenos provenientes da circulação sanguínea, e apresentação destes antígenos para os linfócitos T, provocando assim a ativação dos linfócitos T e B e a produção de anticorpos que deixarão o baço por meio dos vasos linfáticos eferentes (BATISTA et al., 2005).

O baço reage a infecções gerais, no entanto, raramente, é o local primário de doenças. Os macrófagos em seus cordões esplênicos, exercem ativamente a fagocitose sobre as células e agente infecciosos (DA SILVA et al., 2012). Inclusive, sua relevância na remoção de algumas espécies importantes de bactérias encapsuladas no sangue, já foi extensivamente, estudada, sendo bem aceita atualmente (MARQUES et al., 2002).

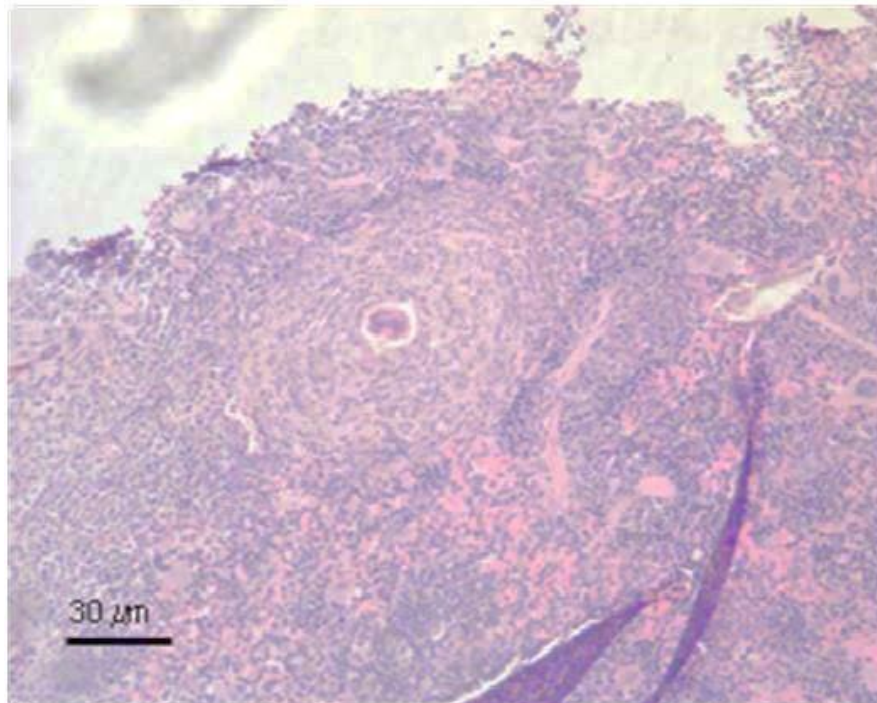
Na infecção esquistossomótica, o baço é um dos importantes órgãos afetados e o aumento do seu volume (esplenomegalia) é decorrente de dois importantes fatores: ação constante da pressão com estase sanguínea sobre sua estrutura esponjosa e um processo de hiperatividade imunológica (DKHIL et al., 2017). A ocorrência destes fatores são uma consequência reacional que se inicia devido aos ovos do helminto. Os que não caíram na luz intestinal, para dar continuidade ao ciclo, são carregados pela corrente sanguínea e acabam retidos no tecido do hospedeiro, especialmente, no fígado, intestino, baço e pulmões (LENZI et al., 1998; SOUZA et al., 2011; MCMANUS et al., 2018). Ao seu redor, se inicia uma reação inflamatória (granulomas) (Figura 4), caracterizando a patologia da esquistossomose. No decurso da infecção, esta reação granulomatosa, acarreta o surgimento de fibrose hepática, alterando o fluxo sanguíneo hepático que, então, se torna hepatofugal, resultando em aumento

de fluxo e estase no sistema venoso colateral, principalmente, na veia esplênica, aumentando a carenagem das linhagens sanguíneas no baço, com consequente desenvolvimento da esplenomegalia (CORREIA et al., 2009).

Embora a maioria dos indivíduos infectados pelo *S. mansoni* sejam assintomáticos, em 5% a 10% dos casos, a fibrose periportal hepática resulta em doença grave, incluindo hipertensão portal, esplenomegalia e varizes esofágicas (FERREIRA et al., 2017).

FREITAS et al., (1999) mostraram através de estudo morfométrico do tecido esplênico, que o aumento do baço na infecção esquistossomótica não se deve somente à expansão congestiva da polpa vermelha, mas também está ligado ao aumento das trabéculas fibrosas. Também ocorreram várias alterações na polpa branca, consideradas pelos autores imprevisíveis e variáveis, pois alguns folículos aparentavam estar aumentados e com centro largo e claro, enquanto outros eram atróficos e possuíam níveis de fibrose.

Figura 4 - Granuloma esquistossomótico no tecido esplênico



Fonte: DA SILVA et al., 2012.

Parâmetros bioquímicos na esquistossomose

Por se tratar de um parasito sanguíneo, os vermes de *S.mansoni* são altamente dependentes do metabolismo do hospedeiro e alterações fisiológicas podem ser fatores importantes no curso da infecção, influenciando a relação parasito-hospedeiro (ALENCAR et

al., 2016). Durante a infecção esquistossomótica ocorrem alterações envolvendo tanto o metabolismo proteico quanto o lipídico. Em relação às alterações bioquímicas do metabolismo proteico, pode se destacar a redução das albuminemias e elevação das globulinas (especialmente da fração gama) (COUTINHO, 2008).

Pesquisas demonstram que a esquistossomose contribui para o agravamento de uma desnutrição antecedente. Estes agravos ocorrem devido a quatro fatores fundamentais: redução da ingestão de nutrientes devido à falta de apetite; redução na absorção dos nutrientes pelo trato gastrointestinal em decorrência das lesões da parede do intestino; redução na utilização dos nutrientes, principalmente, decorrentes de lesões hepáticas; e, finalmente, a excreção anormal de nutrientes e eletrólitos. Através de estudos associando a desnutrição e a infecção esquistossomótica, observou-se uma redução das proteínas totais no soro, com hipoalbuminemia relevante, nos animais esquistossomóticos desnutridos quando comparados aos animais eutróficos (COUTINHO et al., 1991).

Em relação ao metabolismo de lipídios durante a esquistossomose, estudos demonstram uma diminuição na concentração sanguínea de lipídios e fosfolipídios, e redução da fração éster do colesterol (MULLER et al., 2001; DOENHOFF et al., 2002; RAMOS et al., 2004; NEVES et al., 2006; ALENCAR et al., 2016). RAMOS et al., (2004) também encontraram redução nas taxas dos lipídios plasmáticos: colesterol total, triglicerídeos e fosfolipídios, em primatas não humanos *Callithrix jacchus* (sagui) infectados com o trematódeo. Segundo o autor, este modelo experimental possui a composição lipídica e das proteínas plasmáticas bastante similares àquelas encontradas em plasma de humanos.

Os danos no tecido hepático devido a formação dos granulomas esquistossomóticos podem causar alterações na síntese de proteínas, concentrações reduzidas de lipoproteínas, alterações na contagem de índices sanguíneos, como neutropenia, linfopenia e eosinofilia, e um aumento nos níveis de enzimas hepáticas (COUTINHO, 2008). A dosagem dos níveis séricos de enzimas como γ -GT, fosfatase alcalina, transaminase glutâmico oxalacética (TGO) e transaminase glutâmico pirúvica (TGP) pode avaliar o grau destas lesões hepáticas (TANABE, 2003). SILVA, (2018) em seus estudos observaram níveis circulantes aumentados destas enzimas hepáticas em pacientes esquistossomóticos.

O perfil da resposta imunológica na esquistossomose

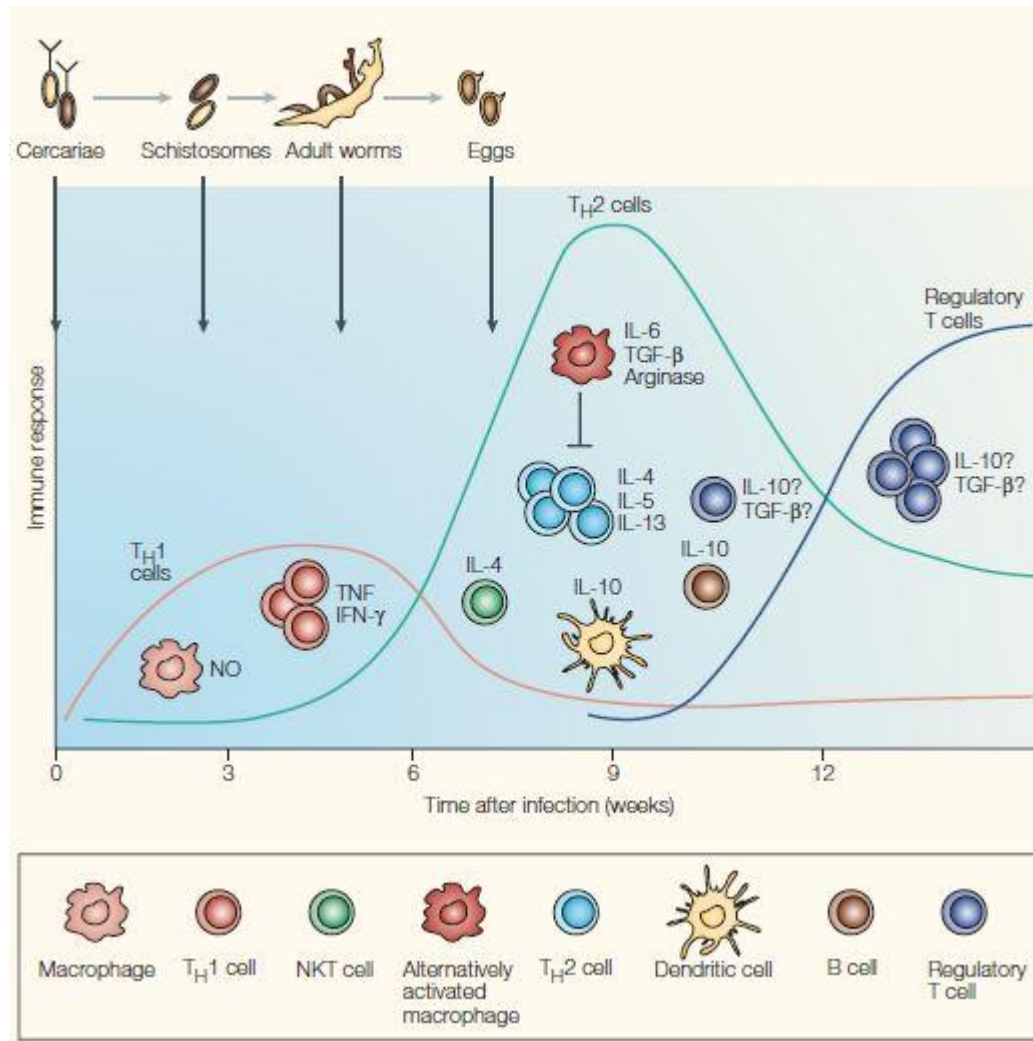
A esquistossomose é classificada clinicamente em fase aguda e fase crônica. A fase aguda é dividida em dois períodos: o pré patente, antes da oviposição e o patente, após a oviposição (HIATT et al., 1979).

Acredita-se que os antígenos dos esquistossômulos, sejam os principais responsáveis pela resposta imunológica na fase pré-patente da infecção (HIATT et al., 1979; CAPRON; DESSAINT, 1985; BUTTERWORTH et al., 1994) onde prevalece a resposta imune do tipo 1 (Th1), com elevada produção de Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α), interferon gama (IFN- γ) e interleucinas 2 (IL-2), 6 (IL-6) e 12 (IL-12) (VELLA; HULSEBOSCH; PEARCE, 1992; HOFFMANN; CHEEVER; WYNN, 2000; PEARCE; MACDONALD, 2002).

Após o início da oviposição, que ocorre a partir de 5-6 semanas de infecção, os antígenos provenientes dos ovos do parasito, retidos nos tecidos do hospedeiro, mobilizam a produção das interleucinas 4 (IL-4) e 5 (IL-5), sendo estas, responsáveis pelo estímulo aos eosinófilos circulantes e à uma produção de imunoglobulina E (IgE). O aumento de IL-10 e IL-13, neste mesmo período, induz a inibição na produção de citocinas da resposta inicial (IL-12, TNF- α e IFN- γ), estimulando uma alteração do tipo de resposta imune de perfil Th1 para o perfil Th2 (CANDIDO et al., 2017). Na resposta do tipo Th2, ocorre a produção das citocinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13, que estimulam a proliferação de linfócitos B, produção de imunoglobulina E (IgE) e imunoglobulina G (IgG), e diferenciação de eosinófilos e mastócitos (CANDIDO et al., 2017). Esta modulação na resposta imunológica é primordial para o recrutamento e ativação de tipos celulares responsáveis pela formação dos granulomas (CASTRO, 2016) (Figura 5).

Na fase crônica da infecção esquistossomótica, a resposta do tipo 1 é completamente reduzida e as funções inerentes à resposta do tipo 2, bem como a eosinofilia e a produção de anticorpos permanecem (PEARCE; MACDONALD, 2002; ABDALA, 2012).

Figura 5 – Balanço da produção de citocinas Th1 e Th2 e Treg em infecção primária por *S.mansoni* em camundongos



Fonte: DUNNE; COOKE, 2005.

O consumo de etanol e sua ação no organismo

De acordo com o Relatório de Status Global sobre Álcool e Saúde de 2018, divulgado pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 2018), cerca de 5,3% de todas as mortes globais, foram atribuídas ao consumo de bebida alcoólica, sendo esta causa, maior do que doenças como tuberculose, HIV / AIDS e diabetes. Este mesmo relatório, aponta que 6,9% das mortes no Brasil em 2016 foram atribuídas ao abuso do consumo de álcool, e destas, 69,5% (homens) e 42,6% (mulheres) foram causadas por doenças hepáticas decorrentes deste abuso. Estima-se que 5,6% dos brasileiros preencham critérios para abuso ou dependência de bebidas

alcoólicas, sendo o etilismo, um sério problema de saúde pública que tem aumentado, progressivamente, acarretando altos custos ao sistema de saúde (MANGUEIRA et al., 2015).

O principal órgão envolvido no metabolismo dessa substância é o fígado, sendo este órgão então, o mais suscetível aos produtos tóxicos gerados na metabolização desta substância (SHUKLA; LIM, 2013). A doença hepática alcoólica (DHA) é a primeira manifestação clínica do abuso da ingestão de etanol, presente nas bebidas alcoólicas, podendo evoluir para o estágio cirrótico e até mesmo câncer (PARK et al., 2006; NAGATA; SUZUKI; SAKAGUCHI, 2007). Todavia, o abuso agudo e crônico dessa substância, pode causar alterações estruturais em vários órgãos, como atrofia no baço e no timo (COOK, 1998), além de ser considerado um fator que interfere na atividade imunológica, provocando a inibição da reprodução das células T CD3⁺, diminuição das células T CD8⁺ e, conseqüentemente, das suas subpopulações distintas, células Th1, Th2 e Th17 (LANZKE et al., 2017). Segundo PRUETT; HAN; WU (1994), a ingestão crônica (8 dias) de etanol em camundongos resultou em uma diminuição no tamanho e número de células no timo, baço e linfonodos.

A ingestão de etanol induz uma modulação da resposta imune inata e adaptativa, que pode variar dependendo do tempo de exposição à esta substância, bem como, o seu nível no sangue (CREWS et al., 2006). Estudos anteriores mostraram que a capacidade de apresentação de antígenos por monócitos e células dendríticas, foi diminuída após a exposição ao etanol (MANDREKAR et al., 2004; DOLGANIUC et al., 2006).

O abuso de bebidas alcoólicas traz alterações comportamentais como maus hábitos de higiene (SILVA et al., 2016), que aumentam o contato com agentes infecciosos, incluindo os parasitos. Estudos anteriores demonstraram uma frequência maior de nematoides intestinais, especialmente, a espécie *Strongyloides stercoralis* Bavay, 1876 em alcoólatras (ZAGO-GOMES et al., 2002) mostrando inclusive, que o alcoolismo beneficia a infecção, aumentando a sobrevivência deste parasito no duodeno e a liberação de suas larvas (MARQUES et al., 2010).

Esquistossomose x condições não infecciosas

Os atuais movimentos populacionais migratórios e as alterações na dieta e no estilo de vida que podem afetar as áreas endêmicas da esquistossomose, tornam estudos que avaliem comorbidades entre esta parasitose e condições não infecciosas extremamente relevantes. Sendo necessários, principalmente, para avaliar o comportamento da infecção e órgãos afetados por essas situações. Alguns estudos anteriores, já demonstraram que alterações não

infeciosas podem modificar o curso da infecção, beneficiando ou não o helminto e, como consequência, acarretando em maior prejuízo ou não, ao organismo do hospedeiro.

NEVES et al., (2007a) em seus estudos sobre os efeitos da dislipidemia durante a esquistossomose na fase aguda, demonstraram o favorecimento dos helmintos adultos, quando roedores foram submetidos a uma dieta rica em gordura. Aumentando a quantidade de ovos liberados pelas fêmeas do helminto e, conseqüentemente, os danos ao hospedeiro. Os lipídios induzem o parasito a expressar uma proteína de superfície, que possuem receptores de colesterol circulante. Esta associação da proteína e colesterol protege e favorece o parasito contra a resposta imune do hospedeiro. Esta associação, da esquistossomose e dislipidemia, revelou também uma desorganização na estrutura do baço com decréscimo de células da polpa branca e polpa vermelha, e hiperplasia no centro germinativo, comprometendo assim a geração de respostas imunes pelo hospedeiro (DA SILVA et al., 2012).

Camundongos esquistossomóticos desnutridos apresentaram diminuição no granuloma periovular, e alterações importantes no desenvolvimento dos vermes adultos, quando comparados aos animais esquistossomóticos bem nutridos (NEVES et al., 2001; SIMÕES et al., 2002; COUTINHO et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2004) . Além disto, os animais com essa comorbidade, produzem uma resposta imune celular e humoral, com títulos de anticorpos e produção de citocinas (IFN - γ , IL-4 e IL10) em níveis muito mais baixos do que os animais eutróficos em fase aguda da infecção, alterando o perfil padrão de resposta nesta fase. (COUTINHO et al., 2010).

Estudo realizado associando a diabetes e a esquistossomose, mostrou que os helmintos adultos se beneficiam da glicose, visto que a energia gerada a partir dela, permite que migrem pelos tecidos, invadam o sistema vascular e escapem do sistema imunológico do hospedeiro (HULSTIJN et al., 2001). Outro estudo, onde se comparou os níveis séricos de glicose e lipídios, entre pacientes com esquistossomose crônica e indivíduos sem esquistossomose, constatou que os pacientes com infecção por *Schistosoma japonicum* tinham níveis, significativamente, mais baixos de glicose, triglicerídeos e colesterol do que aqueles sem a infecção (DUAN et al., 2018).

A associação entre a esquistossomose e a síndrome metabólica foi demonstrada utilizando o modelo C57BL/6. Embora tenha havido uma diminuição dos níveis lipídicos e da esteatose no fígado do hospedeiro devido a infecção, os granulomas periovulares e as alterações decorrentes da síndrome metabólica, como depósito de fibras de colágeno nos vasos sinusoidais e processos inflamatórios, tornaram as lesões hepáticas mais intensas (FILOMENO, 2017).

Alguns resultados demonstram que as parasitoses, incluindo a esquistossomose, suprimem as respostas inflamatórias e restauram a homeostase da glicose, melhorando a sensibilidade à insulina em modelos animais, além da homeostase metabólica (HUSSAARTS et al., 2015). Devido a isto, alguns autores até sugerem o uso de parasitoses como terapia para doenças inflamatórias crônicas não bacterianas (HUSSAARTS et al., 2015; DUAN et al., 2018).

GÓES et al., (2016), analisaram os efeitos da estreptozotocina e da esquistossomose mansônica, na biodistribuição de Tecnécio sestamibi (^{99m}Tc), um radionuclídeo amplamente disponível para a marcação de radiofármacos utilizados na medicina nuclear. Os resultados deste estudo, mostraram diminuição na captação de radiofármacos, principalmente no fígado e no pâncreas, que são, respectivamente, órgãos onde ocorrem alterações fisiopatológicas na esquistossomose mansônica e no diabetes.

Apesar de poucos, estudos anteriores associando a esquistossomose e a ingestão de etanol, já demonstraram alterações morfométricas em granulomas esquistossomóticos. CASTRO et al., (1993) constataram uma redução do diâmetro dos granulomas hepáticos em camundongos com 120 dias de infecção (fase crônica), submetidos a ingestão de etanol a 7% em água, antes ou após a infecção. Antes disto, ORREGO et al., (1981) submeteu camundongos a uma dieta líquida contendo em sua composição 35% de etanol, onde também observou redução no tamanho dos granulomas hepáticos.

Em recente estudo, a associação da infecção experimental pelo *S. mansoni* e a ingestão de etanol à 18% por 28 dias, resultou em diversas alterações morfológicas no helminto como: danos no tegumento dos parasitos machos com modificações nos espinhos e tubérculos, descamação tegumentar e lesões erosivas. Além de alterações no sistema reprodutor tanto de machos quanto de fêmeas, resultando em um aumento no número de ovos imaturos e mortos no intestino destes camundongos. No parênquima hepático, a área dos granulomas aumentou em todos os estágios evolutivos, e, houveram também outras alterações além das comuns durante a infecção, como a microesteatose alcóolica, presença de necrose e infiltrado mononuclear, caracterizando a hepatite alcóolica, e exacerbando os danos hepáticos (BRANDÃO-BEZERRA, 2016).

Em todas essas associações abordadas, houveram alterações no helminto (comportamentais e/ou morfológicas), e também no organismo do hospedeiro, corroborando a importância deste tipo de estudo.

A esquistossomose, assim como as demais parasitoses, é uma doença negligenciada e está diretamente relacionada a pobreza. Já o alcoolismo, que é uma doença crônica, está

inserido em todas as classes sociais, causando ao indivíduo maior vulnerabilidade e podendo ser considerado um fator de risco para doenças infecciosas, incluindo as parasitoses.

Perante o exposto e devido a prevalência e distribuição geográfica da esquistossomose e do consumo de álcool, não se pode excluir a possibilidade de que indivíduos tenham esta comorbidade. E, tendo em vista a escassez de trabalhos acerca desta associação, torna-se preponderante mais estudos que avaliem as alterações no organismo decorrentes dessas situações simultaneamente.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar os possíveis efeitos, tanto no tecido esplênico, quanto no perfil da resposta imunológica de camundongos em fase aguda da esquistossomose, submetidos à ingestão de etanol.

2.2 Específicos

- a) Analisar as possíveis alterações sanguíneas (celulares e bioquímicas) provocadas pela infecção esquistossomótica associada à ingestão de etanol;
- b) Analisar a produção de citocinas produzidas pelas células peritoneais e linfócitos do tecido esplênico;
- c) Caracterizar, através de análise histopatológica, possíveis alterações no tecido esplênico decorrentes da infecção esquistossomótica associada à ingestão de etanol;
- d) Realizar estudo quantitativo das estruturas do tecido esplênico através da estereologia utilizando o método D36 e morfometria da polpa branca;
- e) Quantificar megacariócitos no tecido esplênico.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Os animais utilizados neste estudo foram camundongos da espécie *mus musculus*, linhagem Swiss Webster, machos, com 60 dias de vida. Foram utilizados o número total de 24 animais sendo, 5 nos grupos não infectados e 7 nos grupos infectados.

Durante o experimento os animais tiveram livre acesso à água e ração, sendo mantidos em gaiolas de polipropileno (40 x 33 cm), em uma sala com umidade (60 ± 10 %) e temperatura ($21 \pm 1^\circ\text{C}$) controladas, expostos a ciclos de luz artificial e escuro (12/12 horas) e exaustor para circulação do ar.

3.2 Comitê de Ética

Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal, do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ), sob o protocolo de número CEUA/009/2015.

3.3 Infecção experimental

Para a infecção experimental, foram utilizadas cercarias da cepa BH (Belo Horizonte), do *S. mansoni*, fornecidas pelo Laboratório de Malacologia do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, que foram injetadas por via subcutânea no dorso dos animais (± 80 por animal). Os animais não infectados foram mantidos como controles negativos.

Para confirmar a infecção experimental, o método de Kato-Katz (KATZ; CHAVES; PELLEGRINO, 1972) foi realizado 8 semanas após a infecção (Figura 6).

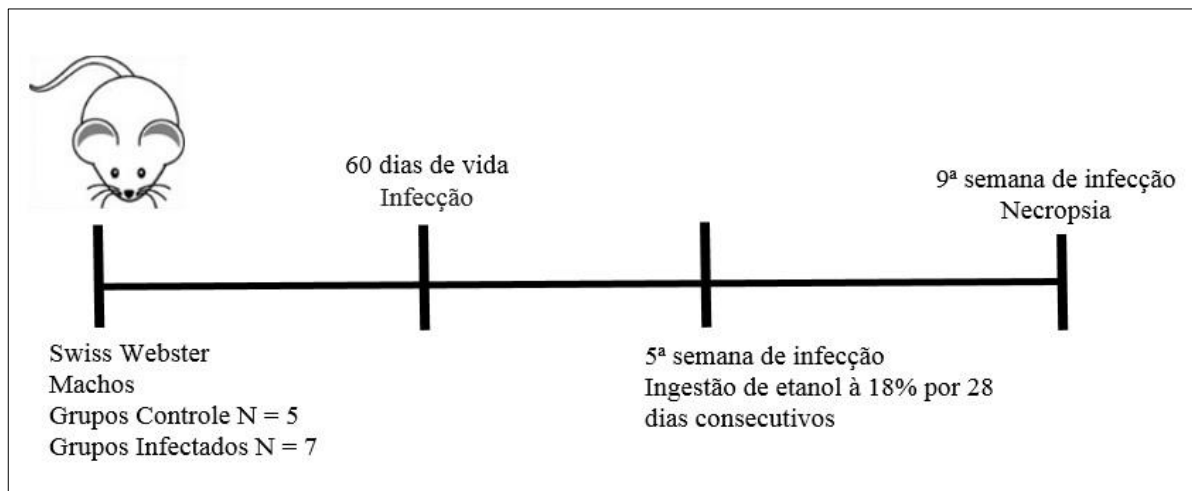
3.4 Administração do etanol

Neste estudo, dois grupos de animais receberam durante 28 dias consecutivos, uma vez ao dia, 200 µl de etanol 18%. A administração ocorreu por via oral, com o auxílio de uma cânula acoplada a uma seringa (gavagem). No grupo infectado, a ingestão do etanol iniciou-se na quinta, estendendo-se até a nona semana de infecção (BRANDÃO-BEZERRA, 2016).

O teor alcoólico de 18% equivale a bebidas como saquês e alguns vinhos, especialmente o vinho do porto e vermute. Por se tratar de um estudo inédito, escolheu-se esta porcentagem como um meio termo entre as bebidas mais consumidas: a cerveja, cujo teor alcoólico varia entre 5% e 9%, e as bebidas destiladas como vodka, cachaça e uísque, que possuem teor alcoólico acima de 38%. Ao final deste experimento cada animal ingeriu o total de 5,6 mL de etanol 18% ou 1,008 mL de etanol.

Devido ao estresse gerado nos animais pela ingestão do etanol por gavagem diariamente, e, para que houvesse um padrão entre todos os grupos, os outros animais, separados em dois grupos, receberam também pelo mesmo método, 200 µL de água destilada durante o mesmo período (Figura 6).

Figura 6- Desenho experimental



3.5 Grupos Experimentais

Os animais foram separados em 4 grupos de estudo, sendo um número de 5 animais nos grupos controles, e 7 animais nos grupos infectados pelo *Schistosoma mansoni* (Quadro 1).

Quadro1- Grupos experimentais

Grupo C	não infectado e sem etanol (controle);
Grupo CE	não infectado e com ingestão de etanol 18%, durante 28 dias;
Grupo I	infectado e sem etanol;
Grupo IE	infectado e com ingestão de etanol 18%, durante 28 dias.

3.6 Biometria dos animais

A massa corporal dos animais foi mensurada com o uso de balança de precisão, no mesmo dia em que foram eutanasiados. Após a sua retirada, o baço também foi mensurado com o uso de balança de precisão.

3.7 Distensão sanguínea

A distensão sanguínea foi realizada afim de analisar se há diferença, ou não, em alguns tipos celulares sanguíneos entre os grupos de estudo. Para tal, no dia anterior à data da necropsia de cada grupo, foi feito um pequeno corte na cauda de cada animal e uma gota de sangue foi distendida em lâmina histológica. Estas lâminas então foram coradas com o corante hematológico panótico (Laborclin), conforme o quadro 2 para posterior análise.

Quadro 2- Protocolo do corante hematológico Panótico

REAGENTES	SUBMERSÃO/ TEMPO
1 - Fixador – Solução de Trarilmetano a 0,1%	Movimentos contínuos para cima e para baixo por 5 segundos.
2 - Corante – Solução de Xantenos a 0,1%	Movimentos contínuos para cima e para baixo por 5 segundos.
3 - Corante - Solução de Tiazinas a 0,1%	Movimentos contínuos para cima e para baixo por 5 segundos.
4 - Água Deionizada Tamponada - (pH 7)	Lavar após o último corante e deixar escorrer o excesso da água.

3.8 Leucograma

Após a secagem, para realizar a contagem diferencial dos leucócitos, as lâminas foram lidas em microscopia de luz, no microscópio Olympus Standard modelo CX-21. Para compensar a má distribuição dos leucócitos entre o centro e a borda da distensão, nesta contagem foi utilizado o método de Ameia Modificado (Figura 7) onde são contados dois campos paralelos e perto da borda da distensão, depois quatro campos em ângulo reto e dois campos paralelos ao bordo, até completar as 100 células (BAIN, 2016). Foram considerados os seguintes tipos celulares: linfócitos, neutrófilos, bastões, monócitos e eosinófilos.

Figura 7 - O esquema acima demonstra a técnica utilizada para a leitura da distensão sanguínea pelo método de Ameia Modificado



Fonte: BAIN, 2016.

3.9 Necropsia

A eutanásia dos animais ocorreu após 9 semanas de infecção. Momentos antes, injetou-se 100 µL de heparina (anticoagulante) nos animais que após o óbito, em câmara de CO₂, tiveram a cavidade torácica aberta para obtenção do sangue através de punção cardíaca.

3.10 Dosagens Bioquímicas

As amostras de sangue obtidas foram acondicionadas em microtubos e, posteriormente, foram centrifugadas (2.500 RPM por 20 minutos) para obtenção do soro, que foi congelado e mantido à temperatura de -20°C, para posterior dosagem bioquímica no equipamento semiautomático Bioclin 100.

Para medir o nível de glicose no sangue dos animais adicionou-se uma gota de sangue em uma tira-teste de glicemia (Lote S03150, validade 12/04/2017) e lida no glicosímetro G-Tech.

Para o lipidograma, todos os lipídios foram extraídos pelo teste enzimático colorimétrico, onde foram dosados o colesterol total, as lipoproteínas de alta densidade (HDL) e o triglicerídeo. Enquanto que, para obter os valores das lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e das lipoproteínas de baixa densidade (LDL), foram utilizados os seguintes cálculos:

$$\text{Colesterol VLDL} = \frac{\text{Triglicerídeo}}{5}$$

$$\text{Colesterol LDL} = \text{Colesterol total} - (\text{Colesterol HDL} + \text{Colesterol VLDL})$$

Todos os resultados obtidos no lipidograma foram expressos em mg/dl.

Para obter os resultados do hepatograma foram utilizados tanto testes enzimáticos colorimétricos quanto testes cinéticos. Dos testes colorimétricos foram dosadas proteínas totais e albumina e, dos testes cinéticos foram dosados TGO, TGP, fosfatase alcalina e γ -gt. Os resultados de TGO/AST, TGP/ALT, fosfatase alcalina e γ -GT foram expressos em U/L, enquanto que os resultados de albumina e proteínas totais foram expressos em g/dL.

Para validação e liberação do equipamento foram utilizados os controles de qualidade controle normal Biocontrol N (Lote 0053, validade 06/2018) e o controle patológico Biocontrol P (Lote 0041, validade 04/2018), ambos da marca Bioclin.

As orientações do fabricante dos kits utilizados (Bioclin) foram aplicadas para todas as avaliações descritas previamente. Segue no quadro 3, as informações sobre lote e referência de cada analito.

Quadro 3 – Testes bioquímicos realizados

Analitos	Referência Lote
Colesterol total	K083-2 0036
Triglicerídeo	K117-2 0018
HDL	K071-23 0082
TGO/AST	K048-6 0081

TGP/ALT	K049-6 0078
Fosfatase alcalina	K021-1 0045
Gama GT	K080-2 0044
Albumina	K04 0126
Proteínas totais	K031-1 0135

3.11 Obtenção de células peritoneais para dosagem de citocinas

Para a obtenção das células peritoneais e dosagem de citocinas produzidas por estas, logo após a punção cardíaca injetou-se 5 mL de meio RPMI no peritônio de cada animal, que foram brevemente massageados para homogeneização. Posteriormente, foi retirado do peritônio dos animais em torno de 4 mL deste conteúdo que foram mantidos em tubos cônicos de 15 mL e acondicionados no gelo. Este material então, foi centrifugado por 10 minutos, 480 g à 4°C e o sobrenadante deste conteúdo foi separado em microtubos (Eppendorf) de 1 mL que foram congelados em freezer -80°C para posterior dosagem.

Para a dosagens das citocinas utilizou-se o método *Citometric Bead Array* (CBA) utilizando o *kit Mouse Inflammation* (BD Science Lote- 7318596), onde seguiu-se as recomendações do kit.

3.12 Isolamento dos linfócitos para dosagem de citocinas

Após o procedimento para obtenção do lavado peritoneal, o baço dos animais foi retirado, mensurado em balança de precisão e clivado longitudinalmente em dois segmentos. Um destes fragmentos foi colocado numa placa de Petri contendo meio RPMI e encaminhado para o fluxo laminar, onde foi macerado (em 5 mL de meio RPMI) com o auxílio do êmbolo da seringa contra uma peneira. Em seguida, a solução obtida foi transferida para um tubo cônico de 15 mL e mantida no gelo até decantar. Após 3 minutos, aproximadamente, o sobrenadante foi centrifugado durante 5 minutos, 10.000g à 4°C. O sobrenadante obtido a partir da centrifugação foi descartado e o precipitado foi ressuscitado em 1 mL de tampão ACK 1X, sendo adicionado 5 mL de meio RPMI, em seguida. Centrifugou-se novamente esta solução por 5 minutos, 1500 rpm à 4°C. Seguidamente, retirou-se 10 µL do sobrenadante desta solução e, em um microtubo (Eppendorf), incorporou-se 10 µL de azul de tripan. Desta

última, retirou-se 10 µL para a contagem inicial dos linfócitos em Câmara de Neubauer (DOSSI, 2006).

Após ajustar a concentração de células (2×10^6), adicionou-se à solução com as células o soro fetal bovino, sendo então, transferido 1mL para cada poço da placa de cultura de células. Em 2, dos 4 poços com o material de cada animal, foi adicionado 1 µL de Concanavalina-A para estimular o crescimento dos linfócitos. As placas permaneceram por 48 h na estufa de CO₂ à 35°C e após este período foram centrifugadas por 10 minutos, 1500 rpm à 4°C. O sobrenadante de cada poço foi separado em microtubos de 1,5 mL (Eppendorfs) e congelado em freezer -80°C para posterior dosagem das citocinas (MUSTAFA; BLUMENTHAL, 2016).

Para a dosagens das citocinas utilizou-se o método *Citometric Bead Array* (CBA) utilizando o (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17, (BD Science Catálogo 560485), onde seguiu-se as recomendações do kit.

3.13 Processamento histológico e coloração das lâminas

O outro fragmento do baço foi fixado em formol tamponado 10%, à temperatura ambiente. Após 48 horas, o material foi submetido ao processamento histológico de rotina com etapas de desidratação em série alcoólica gradual, clarificação em xilol e inclusão em parafina conforme Tabela 1. Após a inclusão, os blocos foram cortados em micrótomo, para a confecção das lâminas histológicas, com 5 µm de espessura, sendo então corados em hematoxilina e eosina (H&E), Lennert's Giemsa e Reticulina de Gomori (DA SILVA et al., 2012) (Tabela 1).

Tabela 1- Etapas do processamento histológico, coloração e montagem de lâminas do baço

ETAPAS	OBJETIVO	DURAÇÃO
1. Fixação		
Solução de formol tamponado 10%.	Preservação dos tecidos.	Mínimo de 48 horas.
2. Desidratação		
Série alcoólica crescente.	Remover a água dos tecidos.	15 minutos em cada série alcoólica.
3. Clarificação		
Banhos de Xilol.	Facilitar a impregnação da	15 minutos para cada

	parafina.	série.
4. Impregnação		
Parafina líquida, derretida em estufa a 58°C.	Impregnar todo o tecido, proporcionando mais rigidez.	15 minutos para cada série.
5. Inclusão		
Coloca-se o material em um molde contendo parafina até se solidificar.	Formar bloco de parafina, contendo o material incluído.	Até que a parafina se solidifique.
6. Corte		
Realizados em micrótomo.	Obtenção de cortes seriados com 5µm de espessura.	Não determinado.
7. Coloração		
Etapas: desparafinação, hidratação, coloração, desidratação e clarificação.	Fornecer contraste aos componentes do tecido.	Tempo variável
8. Montagem		
Bálsamo do Canadá	Manter o material próprio para estudo por muitos anos.	Tempo de secagem do bálsamo do Canadá.

Fonte: MOLINARO; CAPUTO; AMENDOEIRA, 2010.

Tabela 2- Colorações utilizadas nos cortes do tecido esplênico

TÉCNICA	FINALIDADE	INTERPRETAÇÃO
<i>Hematoxilina e Eosina (H&E)</i>	Estudo e caracterização morfológica .	Cora o núcleo de roxo e o citoplasma de róseo.
<i>Lennert's Giemsa</i>	Visualização de células.	Cora o núcleo de azul e o citoplasma de violeta.
<i>Reticulina de Gomori</i>	Visualização de fibras reticulares	Cora as fibras reticulares de preto.

Fonte: MOLINARO; CAPUTO; AMENDOEIRA, 2010.

3.14 Análise histopatológica

Para a análise histopatológica todas as estruturas do tecido esplênico foram avaliadas em diferentes objetivas (4X, 10X, 20X, 40X e 100X) em microscópio de campo claro. As imagens foram capturadas por uma câmera Olympus Cell Sens Entry 1.18 (Build 16686).

3.15 Estereologia e Morfometria

A estereologia é um método cada vez mais utilizado para estudar e avaliar quantitativamente os danos e lesões de um órgão através de análises de imagens (campos aleatórios) (MANDARIM-DE-LACERDA, 2003; KARISE et al., 2017). Com esta ferramenta numérica é possível responder perguntas experimentais através de uma estimativa do real. A técnica é composta de um sistema de teste normalmente composto por pontos de teste, linhas de teste sobre um quadro ou área de teste (WEIBEL, 1981). Neste trabalho as possíveis desordens estruturais do tecido esplênico foram avaliadas através do método estereológico D36, constituído por 36 pontos testes (Pt) (Figura 8).

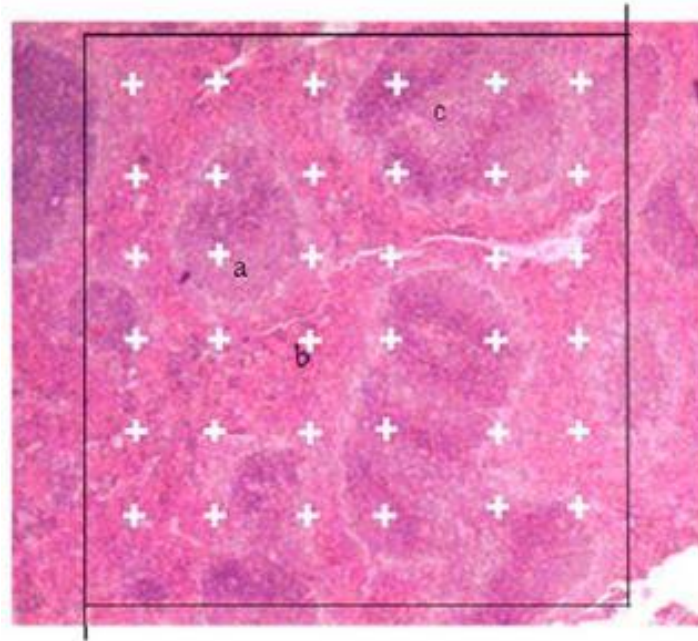
Foram avaliados dez campos aleatórios por animal, em objetiva de 20X, totalizando 50 campos por grupo. Nesta análise, avaliou-se a densidade de volume das seguintes estruturas: polpa branca (Vvpb), polpa vermelha (Vvpv), trabéculas (Vvt) e megacariócitos (Vvm). A densidade de volume (Vv) destas estruturas do tecido esplênico foram calculadas através da seguinte fórmula:

$$Vv = \frac{Pp}{Pt} (\%)$$

onde Pp corresponde aos pontos onde tocam as estruturas.

A análise morfométrica da polpa branca foi realizada de forma aleatória, sendo mensuradas ao todo 10 polpas brancas por animal. As imagens foram captadas por meio de um analisador digital de imagens equipado com câmera (Bel Photonics DV-5000 - 5.0 MP, Bel Engineering, Monza/Itália) e capturadas na objetiva de 10X pelo programa Bel View versão 6.2.3.0 (Bel Engineering, Monza/Itália). Após a captura das imagens foram determinadas a área e o perímetro de cada polpa branca.

Figura 8- Grade contendo 36 cruces utilizada no método estereológico D36



Fonte: GOMES, 2013.

3.16 Quantificação de Megacariócitos

A quantificação dos megacariócitos foi realizada utilizando o software Image Pro Plus- Media Cybernetics, USA. A contagem de células foi feita em área pré-determinada de $600\mu\text{m} \times 800\mu\text{m}$ ($480000\mu\text{m}^2$), sendo avaliados dez campos aleatórios, por animal, em objetiva de 10X, totalizando 50 campos por grupo. Para a contagem, foram apenas consideradas as células cujos os núcleos foram visualizados (GOMES, 2013).

3.17 Análise Estatística

Na análise estatística dos dados foi utilizado o programa GraphPad Prism 5. Inicialmente, foi realizado o teste de normalidade para verificar se os dados se ajustavam à curva normal de Gauss. Então, os grupos foram comparados utilizando o teste não paramétrico Kruskal Wallis seguido de comparações múltiplas de Dunn's. As medidas com valores de $p \leq 0,05$ foram consideradas significativamente diferentes. Os dados serão apresentados em média \pm erro padrão da média ou média \pm desvio padrão da média.

4 RESULTADOS

4.1 Biometria dos animais e massa relativa do órgão

4.1.1 Massa dos animais

Nenhumas das comparações entre os grupos apresentaram diferenças significativas.

4.1.2 Massa do baço

Os resultados da massa dos órgãos mostraram que o grupo infectado, grupo (I) apresentou aumento com diferença significativa quando comparado ao grupo CE (+362%; $p=0,0015$). Já o grupo infectado com ingestão de etanol (IE) apresentou aumento significativo em relação ao grupo não infectado com ingestão de etanol (CE) (+275%; $p=0,0015$) (Tabela 3).

4.1.3 Relação massa do baço/ massa do animal

Nesta análise, observamos aumento significativo na massa relativa do baço nos grupos infectados. No grupo I a massa relativa aumentou 169% quando comparado ao grupo CE +320% ($p=0,0021$). Enquanto o grupo IE aumentou 264% em relação ao grupo CE ($p=0,0021$).

Tabela 3 – Massa corporal, do baço e massa relativa do baço (expresso em gramas) de camundongos infectados ou não e submetidos à ingestão de etanol à 18% ou não, durante 28 dias consecutivos (média \pm desvio-padrão)

	Grupos			
	C	CE	I	IE
Massa corporal	32 \pm 5,3	30 \pm 2,8	35 \pm 1,1	32 \pm 2,3
Massa do baço	0,12 \pm 0,04	0,08 \pm 0,01	0,37 \pm 0,12 ^{&}	0,30 \pm 0,08 ^{&}
Massa Relativa do Baço ^a	0,39 \pm 0,18	0,25 \pm 0,03	1,05 \pm 0,31 ^{&}	0,91 \pm 0,30 ^{&}

Legenda: C: Não infectado e sem ingestão de etanol; CE: Não infectado e com ingestão de etanol; I: Infectado e sem ingestão de etanol; IE: Infectado e com ingestão de etanol. a: **Massa Relativa do baço** = (massa absoluta do órgão/massa corporal do animal) x 100. (&): Diferença significativa (p < 0,05) quando comparado com o grupo CE.

Fonte: A autora, 2019.

4.2 Dosagens Bioquímicas

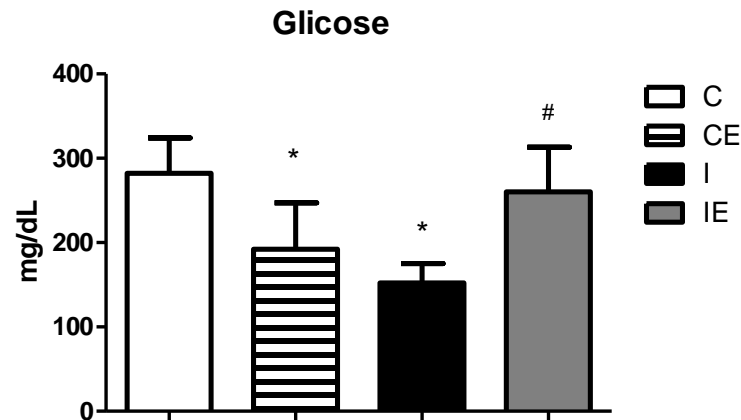
Os resultados obtidos nas dosagens bioquímicas estão listados na tabela 4.

4.2.1 Glicose

Os seguintes resultados foram obtidos: no grupo C- 282 \pm 42, no grupo CE -192 \pm 55, no grupo I- 152 \pm 23 e no grupo IE -260 \pm 53 (Figura 9).

Observou-se que tanto o grupo CE (-31%; p=0,0317) quanto o grupo I (-46%; p=0,0079) apresentaram redução significativa na taxa de glicose (mg/dL) quando foram comparados ao grupo C. Enquanto isso, o grupo IE apresentou um aumento significativo em relação ao grupo I (+71%; p=0,0079).

Figura 9 – Níveis de glicose de camundongos infectados ou não e submetidos à ingestão de etanol 18% ou não, durante 28 dias consecutivos (média±desvio-padrão)



Legenda: C: Não infectado; CE: Não infectado com ingestão de etanol por 28 dias. I: Infectado; IE: Infectado com ingestão de etanol por 28 dias. (*): Diferença significativa ($p < 0,05$) com o grupo C; (#) Diferença significativa ($p < 0,05$) com o grupo I.

Fonte: A autora, 2019.

4.2.2 Lipidograma

Colesterol

Observou-se que nos grupos CE (-39%; $p=0,0079$) e I (-49%; $p=0,0079$) houve uma redução significativa na taxa de colesterol (mg/dL) quando comparados ao grupo C. E o grupo IE ($p=0,0079$) apresentou aumento significativo de 22% em comparação ao grupo I (Tabela 4).

HDL

Nos grupos CE (-35%; $p=0,0159$) e I (-51%; $p=0,0079$) houve uma redução significativa nos níveis de HDL (mg/dL) em relação ao grupo C. Já o grupo IE ($p=0,0079$), apresentou um aumento significativo de 27% em relação ao grupo I.

Triglicerídeos, LDL e VLDL

Sobre estes analitos, não houve diferença significativa na comparação entre os grupos (Tabela 4).

Tabela 4 – Lipidograma de camundongos infectados ou não e submetidos à ingestão de etanol 18% ou não, durante 28 dias consecutivos (média±desvio-padrão)

Analitos	Grupos			
	C	CE	I	IE
Colesterol	106±20	65±10 [*]	54±6 [*]	66±3 [#]
Triglicerídeo	107±28	149±37	121±18	138±12
HDL	74±9	48±12 [*]	36±1 [*]	46±5 [#]
LDL	54±15	47±13	41±9	47±6
VLDL	21±6	30±7	24±4	28±2

Legenda: C: Não infectado; CE: Não infectado com ingestão de etanol por 28 dias. I: Infectado; IE: Infectado com ingestão de etanol por 28 dias. (*): Diferença significativa (p<0,05) com o grupo C; (#) Diferença significativa (p<0,05) com o grupo I.

Fonte: A autora, 2019.

4.2.3 Hepatograma

TGO, TGP, γ -GT e Proteínas Totais

Os resultados destes analitos não apresentaram diferenças estatísticas significativas na comparação entre os grupos (Tabela 5).

Albumina

O grupo IE apresentou diferenças significativas quando comparado ao grupo CE (+44%; p=0,0162) e ao grupo I (+30%; p= 0,0079) (Tabela 5).

Fosfatase Alcalina

Comparado ao grupo C, o grupo I, apresentou redução de 75% sendo inclusive, diferente estatisticamente (p= 0,0079). O grupo IE diminuiu significativamente quando comparado ao grupo CE (-37%; p=0,0079).

Tabela 5 – Hepatograma de camundongos infectados ou não e submetidos à ingestão de etanol 18% ou não, durante 28 dias consecutivos (média±desvio-padrão)

Analitos	Grupos			
	C	CE	I	IE
TGO	99±27	127±41	135±37	132±16
TGP	7±2	6±2	4±2	9±5
Ggt	7±3	5±1	7±1	4±2
Proteínas Totais	6±1	5±1	6±0,2	6±0,5
Albumina	2,4±0,6	1,8±0,5	2±0,1	2,6±0,2 ^{&#}
Fosfatase Alcalina	266±108	129±52	64±13 [*]	81±12

Legenda: C: Não infectado; CE: Não infectado com ingestão de etanol por 28 dias. I: Infectado; IE: Infectado com ingestão de etanol por 28 dias. (*): Diferença significativa ($p < 0,05$) com o grupo C; (&) Diferença significativa ($p < 0,05$) com o grupo CE; (#) Diferença significativa ($p < 0,05$) com o grupo I.

Fonte: A autora, 2019.

4.3 Leucograma

Os resultados obtidos nesta análise, estão na tabela 6.

4.3.1 Bastão

Sobre este tipo celular, observou-se um aumento significativo (+633%; $p = 0,0217$) no grupo IE em relação ao grupo C.

4.3.2 Linfócitos, Neutrófilos e Monócitos

Os resultados destes tipos celulares não apresentaram diferença estatística significativa em nenhuma das comparações entre os grupos.

4.3.3 Eosinófilos

Não foram observados eosinófilos nos grupos não infectados.

Tabela 6 - Leucograma de camundongos esquistossomóticos ou não e submetidos ou não, a ingestão de etanol a 18%, durante 28 dias consecutivos (Média ± desvio-padrão)

Leucograma	Grupos			
	C	CE	I	IE
Linfócitos	68,0±9,9	67,4±10,6	43,0±6,4	57,4±17,3
Bastão	0,6±1,3	3,0±2,9	1,6±1,1	4,4±1,1*
Neutrófilo	23,0±6,9	19,6±7,2	39,6±10,7	26,2±14,9
Monócito	8,4±6,9	10,0±6,9	15,4±7,9	11,2±5,3
Eosinófilo	-	-	0,4±0,9	0,8±1,3

Legenda: C: Não infectado e sem ingestão de etanol; CE: Não infectado e com ingestão de etanol; I: Infectado e sem ingestão de etanol; IE: Infectado e com ingestão de etanol. Diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado: com o grupo C (*).

Fonte: A autora, 2019.

4.3 Histopatologia

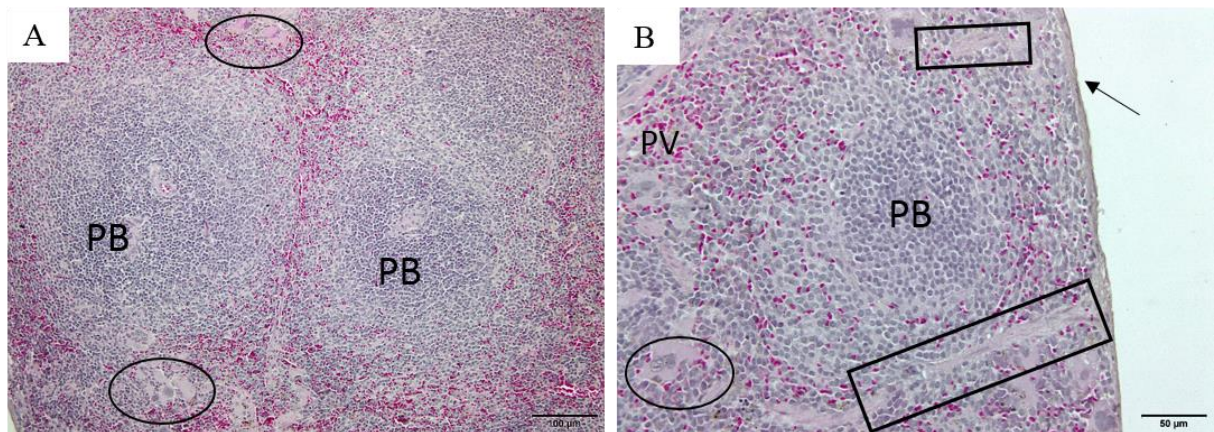
O parênquima esplênico dos animais não infectados e sem ingestão de etanol (grupo C) apresentou polpa branca com forma arredondada e centros germinativos ao centro. A polpa vermelha com seus cordões esplênicos apresentou poucos pigmentos de hemossiderina e alguns megacariócito (Figura 10, imagens A e B). Foi possível observar também, estruturas trabeculares que partem da cápsula e adentram o órgão lhe proporcionando sustentação e fibras reticulares (colágeno tipo III) em todo o tecido (Figura 14, imagens A e B).

A análise histopatológica mostrou alterações expressivas no arranjo estrutural do parênquima esplênico dos animais do grupo CE. Foi observada uma desestruturação da polpa branca, impossibilitando em algumas áreas, sua distinção com a polpa vermelha. Além disso, notou-se um espessamento da cápsula do órgão e um aumento de estruturas trabeculares deste tecido. Pode ser observado a presença intensa de megacariócitos (Figura 11, imagens A, B e C). Através da coloração Reticulina de Gomori, foi possível visualizar as fibras reticulares totalmente fragmentadas, e com aspecto ondulado, bem como, as trabéculas aparentavam estar fragilizadas (Figura 14, imagens C e D).

No tecido esplênico dos animais infectados (grupo I) a polpa branca, manteve a sua forma original “arredondada”, com aumento dos centros germinativos. Pode-se notar uma maior concentração de hemácias e pigmentos de hemossiderina na polpa vermelha. O espessamento da cápsula também foi constatado, bem como uma maior quantidade de estruturas trabeculares. Observou-se também uma presença acentuada de megacariócitos neste tecido (Figura 12, imagens A, B e C). Em relação às fibras reticulares, notou-se apenas que elas estão em maior quantidade (Figura 14, imagens E e F). Por se tratar de uma infecção de fase aguda, nenhum dos dois grupos infectados, grupos I e IE, apresentaram granulomas nesta análise.

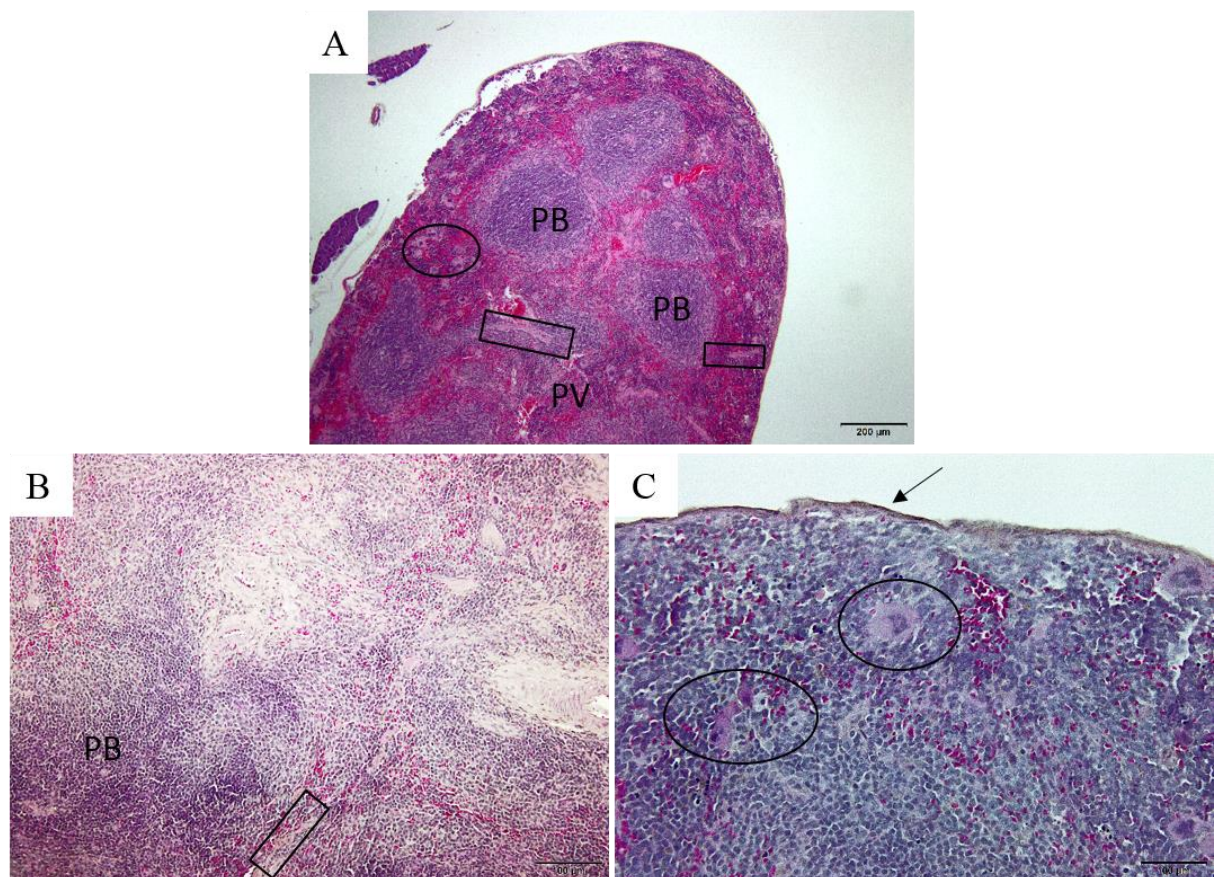
No grupo IE, houve uma importante alteração no parênquima esplênico destes animais. A polpa branca apresentava-se totalmente dispersa, algumas em confluência e com centro germinativo extremamente aumentado. No entanto, em alguns momentos parece haver apenas vestígios dessas estruturas. Na polpa vermelha percebeu-se a maior presença de pigmentos de hemossiderina, um grande número de megacariócitos e, uma maior concentração de hemácias. Notou-se aumento na espessura da cápsula do órgão e na quantidade de trabéculas, ao passo que, estas estruturas aparentavam estar fragilizadas (Figura 13, imagens A, B, C e D). As fibras reticulares aparentavam estar mais delicadas e numa quantidade exacerbadamente menor do que nos outros grupos (Figura 14, imagens G e H).

Figura 10 - Fotomicrografia do tecido esplênico de camundongos não infectados, grupo C



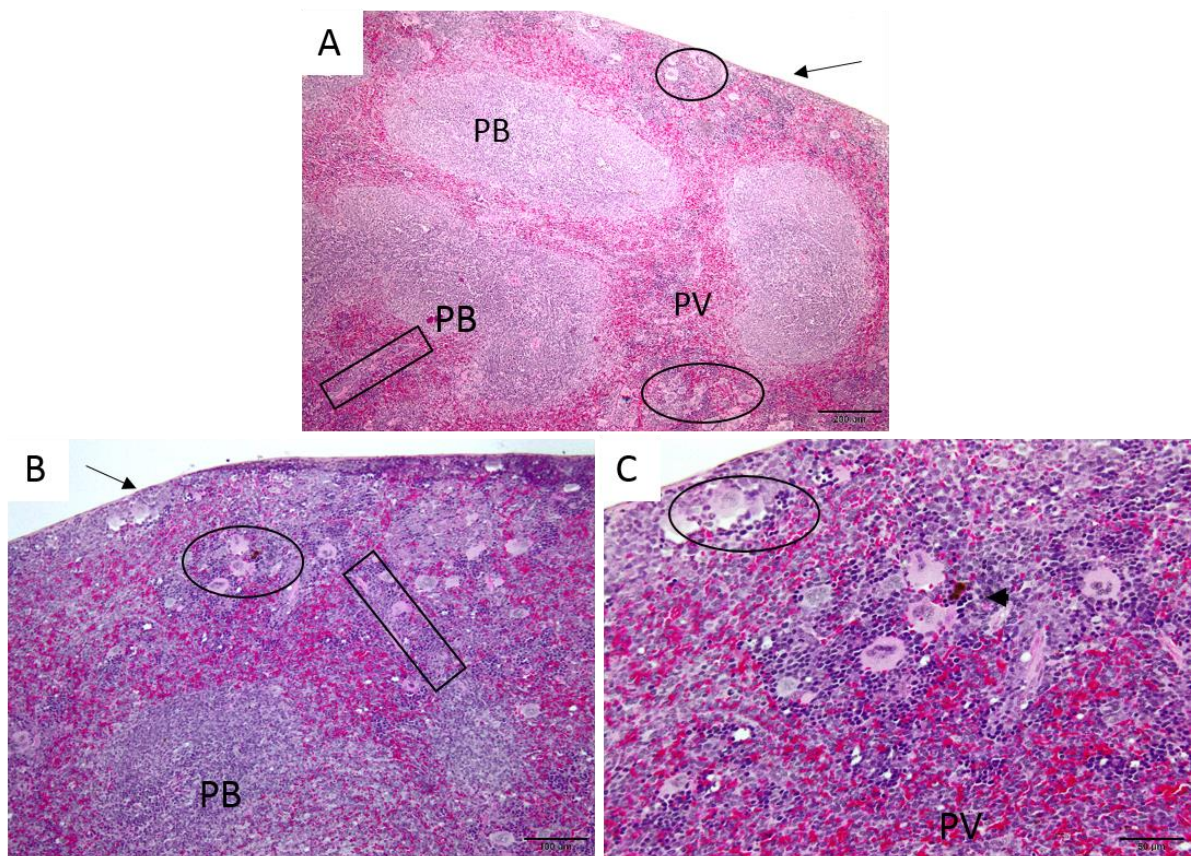
Legenda: Imagem mostrando o parênquima esplênico. (PB)- Polpa Branca; (PV)-Polpa Vermelha; (círculo)- Megacariócitos; (retângulo)- Trabéculas; (seta) cápsula. Coloração H&E. Barras: 100 µm (imagem A); 50 µm (imagem B).

Figura 11 - Fotomicrografia do tecido esplênico de camundongos não infectados e submetidos à ingestão de etanol por 28 dias - grupo CE



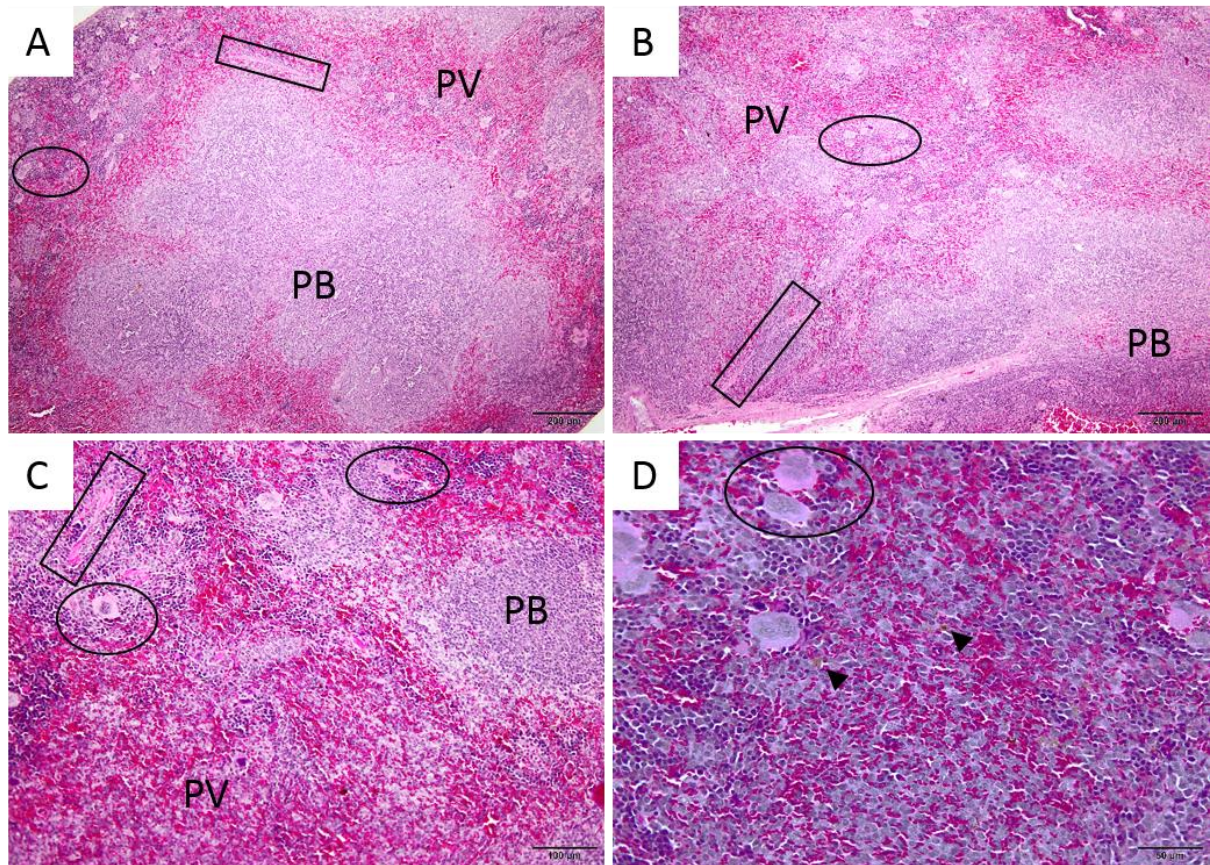
Legenda: Desorganização no parênquima esplênico decorrentes da ingestão de etanol. (PB)- Polpa Branca; (PV)- Polpa Vermelha; (círculo)-Megacariócitos; (retângulo)- Trabéculas; (seta) cápsula. Coloração H&E. Barras: 200 µm (imagem A); 100 µm (imagem B); 50 µm (imagem C).

Figura 12 - Fotomicrografia do tecido esplênico de camundongos infectados pelo *S. mansoni* - grupo I.



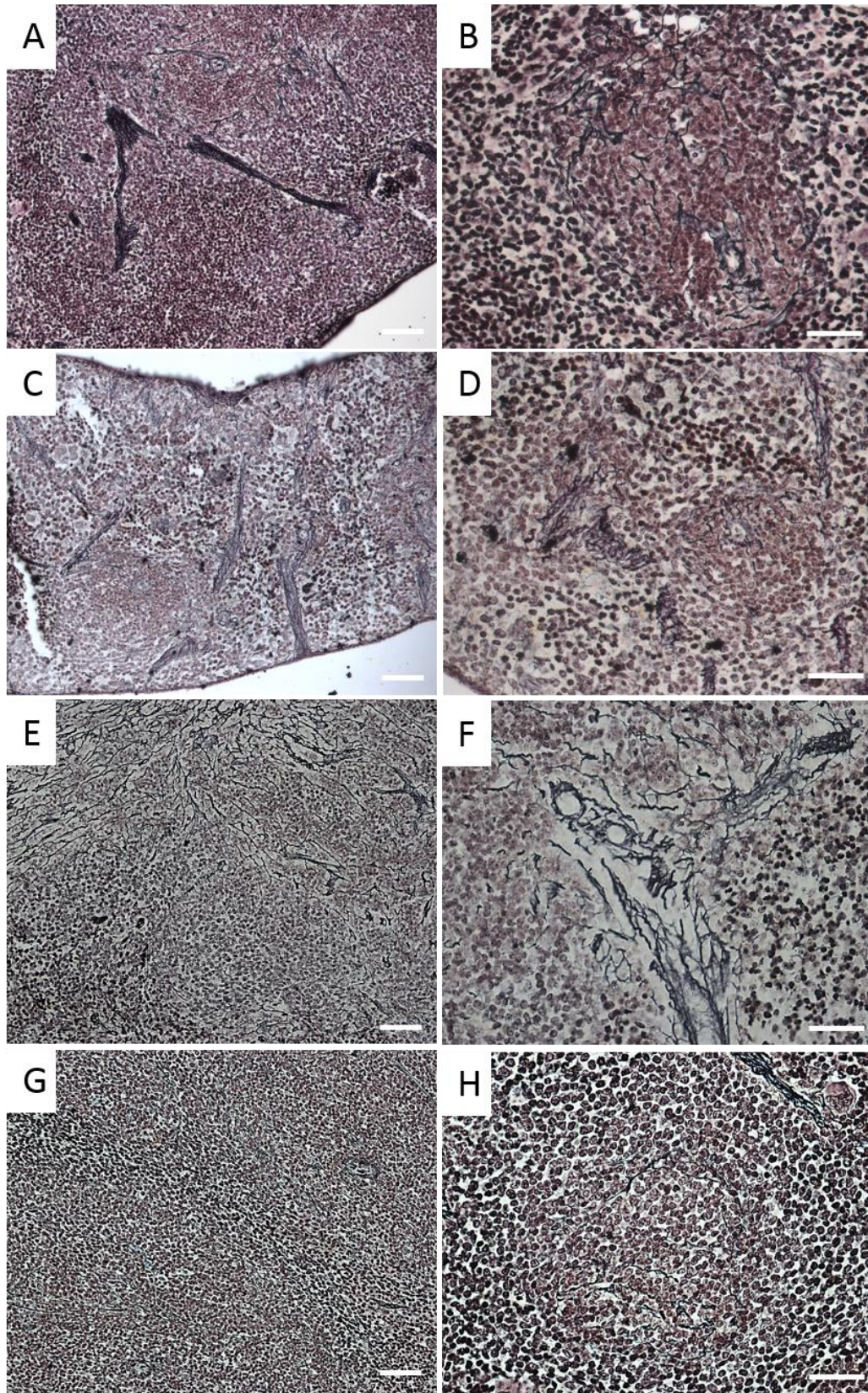
Legenda: Desorganização no parênquima esplênico decorrentes da infecção esquistossomótica. (PB)- Polpa Branca; (PV)-Polpa Vermelha; (círculo)-Megacariócitos; (retângulo)- Trabéculas; (seta) cápsula. Coloração H&E. Barras: 200 μ m (imagem A); 100 μ m (imagem B); 50 μ m (imagem C).

Figura 13 - Fotomicrografia do tecido esplênico de camundongos infectados pelo *S. mansoni* e submetidos a ingestão de etanol 18% por 28 dias consecutivos, grupo IE



Legenda: Desorganização no parênquima esplênico decorrentes da infecção esquistossomótica e ingestão de etanol. (PB)- Polpa Branca; (PV)-Polpa Vermelha; (círculo)-Megacariócitos; (retângulo)- Trabéculas; (cabeça de seta) pigmentos de hemosiderina. Coloração H&E. Barras: 200 μ m (imagens A e B); 100 μ m (imagem C); 50 μ m (imagem D).

Figura 14 – Fotomicrografia do tecido esplênico de camundongos não infectados - grupo C: *Imagem A*; apenas ingestão de etanol 18% por 28 dias consecutivos - grupo CE: *Imagens B e C*; infectado - grupo I: *Imagens D e E*; e infectados com ingestão de etanol - grupo IE: *Imagens G e H*



Legenda: Alterações da quantidade de fibras reticulares, coradas em preto, no tecido esplênico. Coloração Reticulina de Gomori. Barras: 100 μm (A, C, E e G); 50 μm (B, D, F e H).

4.4 Estereologia pelo método D36

Conforme a tabela 7, os resultados estereológicos apontam diferença significativa apenas na densidade de volume das trabéculas, onde o grupo CE apresentou aumento significativo (+100%; $p=0,0162$), quando comparado ao grupo C.

Tabela 7 – Densidade do volume (%) do tecido esplênico de camundongos infectados ou não e submetidos à ingestão de etanol à 18% ou não, durante 28 dias consecutivos (média \pm erro-padrão)

Estereologia D 36	Grupos			
	C	CE	I	IE
Polpa Branca	41 \pm 3	45 \pm 4	37 \pm 2	40 \pm 3
Polpa Vermelha	51 \pm 3	42 \pm 4	51 \pm 3	48 \pm 1
Trabéculas	4 \pm 1	8 \pm 0,3*	8 \pm 1	6 \pm 1
Megacariócitos	3 \pm 1	5 \pm 0,5	4 \pm 1	5 \pm 0,4

Legenda: C: Não infectado e sem ingestão de etanol; CE: Não infectado e com ingestão de etanol; I: Infectado e sem ingestão de etanol; IE: Infectado e com ingestão de etanol. Diferença significativa ($p<0,05$) quando comparado: com o grupo C (*).

Fonte: A autora, 2019.

4.5 Morfometria de polpa branca

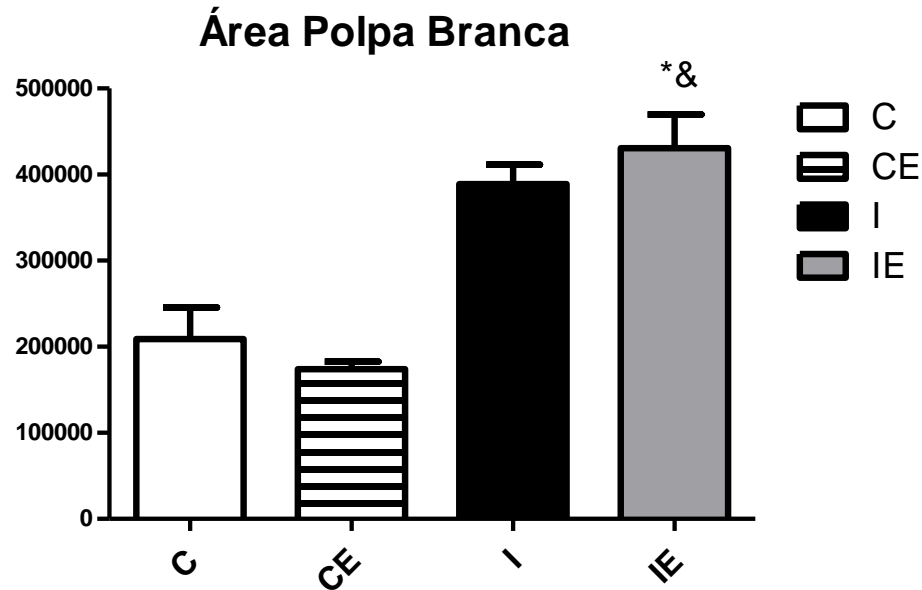
4.5.1 Área

Em relação à área da polpa branca (μm^2), observou-se os seguintes resultados (média \pm desvio padrão): grupo C (208855 \pm 82354), grupo CE (174001 \pm 19655), grupo I (389026 \pm 50404) e grupo IE (430743 \pm 87183). Na comparação entre os grupos, somente o IE foi maior estatisticamente, em relação ao grupo C (+106%; $p=0,0037$) e ao grupo CE (+147%; $p=0,0037$) (Figura 15).

4.5.2 Perímetro

Ao avaliar o perímetro (μm) dessas estruturas, encontrou-se os seguintes valores (média \pm desvio padrão): 1750 \pm 369 no grupo C, 1676 \pm 103 no grupo CE, 2420 \pm 207 no grupo I e 2790 \pm 348 no grupo IE. No grupo IE, observou-se aumento significativo quando comparado ao grupo CE (+66%; $p=0,0029$) e ao grupo C (+59%; $p=0,0029$) (Figura 16).

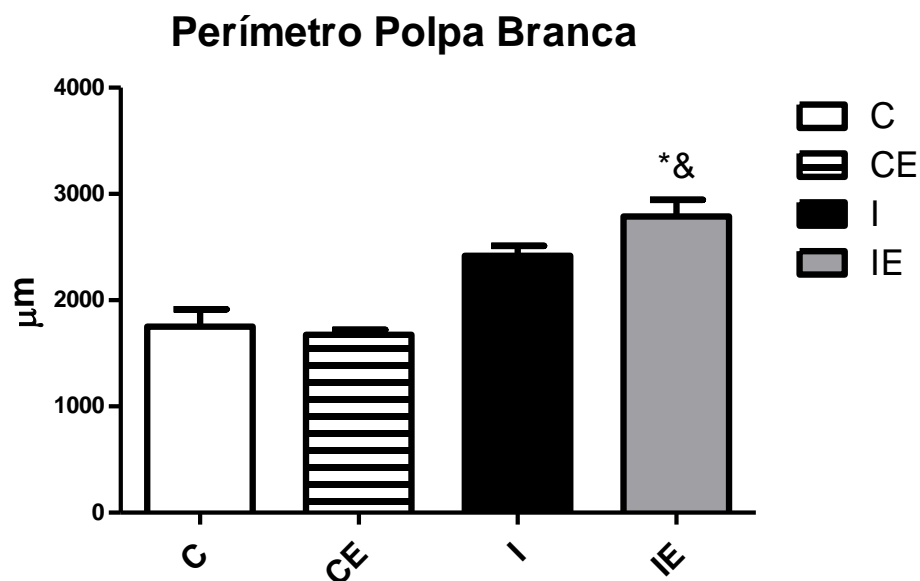
Figura 15 - Área (μm^2) da polpa branca do tecido esplênico de camundongos infectados e submetidos ou não à ingestão de etanol por 28 dias consecutivos (média \pm desvio padrão)



Legenda: C: Não infectado; CE: Não infectado com ingestão de etanol por 28 dias. I: Infectado; IE: Infectado com ingestão de etanol por 28 dias. (*): Diferença significativa ($p < 0,05$) com o grupo C; (&) Diferença significativa ($p < 0,05$) com o grupo CE.

Fonte: A autora, 2019.

Figura 16 - Perímetro (μm) da polpa branca do tecido esplênico de camundongos infectados e submetidos ou não à ingestão de etanol por 28 dias consecutivos



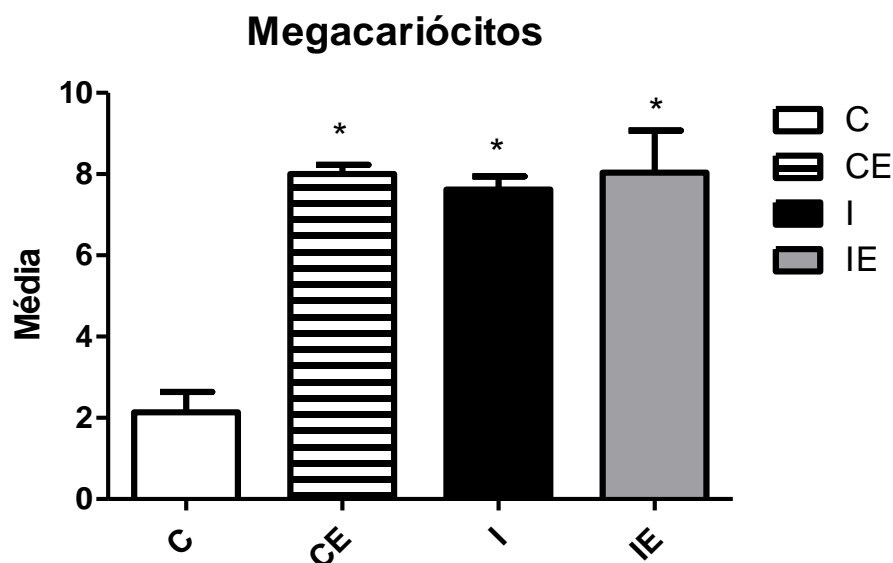
Legenda: C: Não infectado; CE: Não infectado com ingestão de etanol por 28 dias. I: Infectado; IE: Infectado com ingestão de etanol por 28 dias. (*): Diferença significativa ($p < 0,05$) com o grupo C; (&) Diferença significativa ($p < 0,05$) com o grupo CE.

Fonte: A autora, 2019.

4.6 Quantificação de Megacariócitos

Em relação à quantificação de megacariócitos no tecido esplênico obtivemos os seguintes resultados (média± desvio-padrão): grupo C (2,14±1,12), grupo CE (7,8±0,3), grupo I (7,09±0,35) e grupo IE (8,04±2,30). Após a comparação estatística encontramos diferenças significativas nos grupos CE (+290%; p=0,0001), I (+254%; p=0,0001) e IE (+275; p=0,0001) quando comparados ao grupo C (Figura 17).

Figura 17 – Quantificação de megacariócitos encontrados na polpa vermelha do tecido esplênico (média ± desvio-padrão)



Legenda: C: Não infectado; CE: Não infectado com ingestão de etanol por 28 dias. I: Infectado; IE: Infectado com ingestão de etanol por 28 dias. (*): Diferença significativa (p<0,05) com o grupo C.

Fonte: A autora, 2019.

4.7 Dosagem de citocinas produzidas pelas células peritoneais

Entre as citocinas dosadas (TNF, IFN- γ , IL-6, IL-10 e MCP-1) (pg/mL), apenas a IL-10 não foi observada em nenhum dos grupos analisados. Os valores estão listados na tabela 8, figura 18.

4.7.1 TNF

Analisando estatisticamente os resultados desta citocina, não se observou diferenças significativas nas comparações entre os grupos.

4.7.2 IFN- γ

Apenas o grupo IE apresentou resultado para esta citocina.

4.7.3 MCP-1

A produção desta quimiocina foi maior estatisticamente no grupo I, em comparação com o grupo C (+135%; 0,0030) (Tabela 8, figura 18).

4.7.4 IL-6

Esta citocina foi maior nos grupos I (+23600 %; $p=0.0018$) e IE (+32200%; $p=0.0018$), ao serem comparados com o grupo não infectado e sem etanol, grupo C.

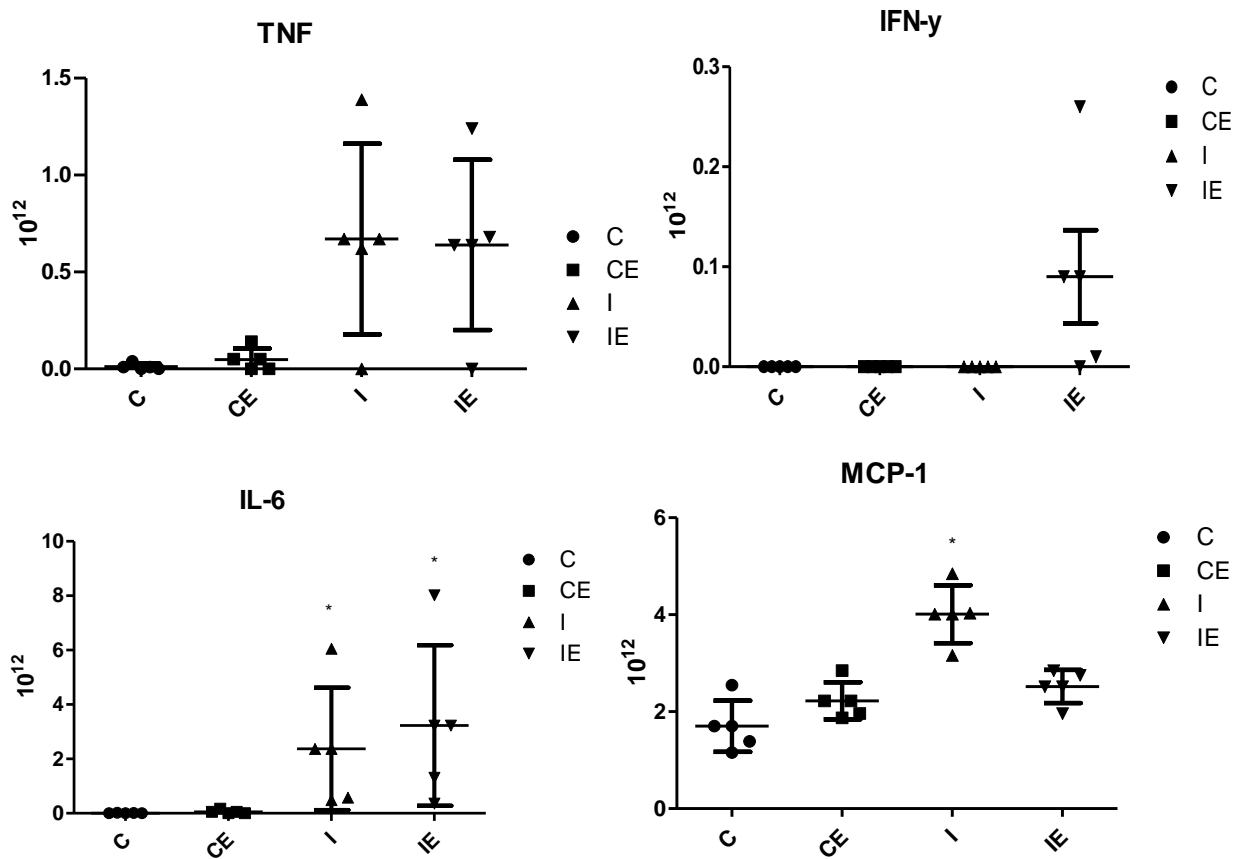
Tabela 8 – Dosagem de citocinas (pg/mL) produzidas por células peritoneais de camundongos infectados ou não e submetidos à ingestão de etanol à 18% ou não, durante 28 dias consecutivos (média \pm desvio-padrão)

Citocinas	Grupos			
	C	CE	I	IE
TNF	0,01 \pm 0,02	0,05 \pm 0,06	0,67 \pm 0,49	0,64 \pm 0,44
IFN- γ	-	-	-	0,09 \pm 0,15
MCP-1	1,70 \pm 0,74	2,23 \pm 0,54	4,01 \pm 0,84*	2,52 \pm 0,49
IL-6	0,01 \pm 0	0,06 \pm 0,10	2,37 \pm 3,18*	3,23 \pm 4,17*

Legenda: C: Não infectado; CE: Não infectado com ingestão de etanol por 28 dias. I: Infectado; IE: Infectado com ingestão de etanol por 28 dias. (*): Diferença significativa ($p<0,05$) com o grupo C.

Fonte: A autora, 2019.

Figura 18 – Citocinas TNF, IFN- γ , IL-6 e quimiocina MCP-1 (pg/mL) produzidas por células peritoneais de camundongos infectados ou não e submetidos à ingestão de etanol à 18% ou não, durante 28 dias consecutivos (média \pm desvio-padrão)



Legenda: C: Não infectado; CE: Não infectado com ingestão de etanol por 28 dias. I: Infectado; IE: Infectado com ingestão de etanol por 28 dias. (*): Diferença significativa ($p < 0,05$) com o grupo C; (#) Diferença significativa ($p < 0,05$) com o grupo CE. (–) Diferença significativa ($p < 0,05$) com o grupo I.

Fonte: A autora, 2019.

4.8 Dosagem de citocinas produzidas por linfócitos

Os resultados desta análise constam na tabela 9 e nas figuras 19 e 20.

4.8.1 IL-10

Os únicos grupos em que houve produção desta citocina foram os infectados, e embora não tenha havido diferença estatística, podemos destacar a diminuição do grupo IE (-95%), em comparação ao grupo infectado, grupo I.

4.8.2 IL-7 A

Nas comparações entre os grupos não se observou diferenças significativas, no entanto destaca-se a diminuição de -57% do grupo IE em relação ao grupo I.

4.8.3 TNF

Sobre esta citocina, a análise estatística apontou aumento significativo no grupo I, quando comparado ao grupo C (+11700%; p=0,0188) (Tabela 9, figura 19).

4.8.4 IFN- γ

Apesar das comparações não apresentarem diferenças estatísticas entre os grupos, destaca-se a diminuição de 99% no grupo IE quando comparado ao grupo I .

4.8.5 IL-4

O grupo I apresentou aumento significativo de (+2021%; p=0.0234) em relação ao grupo C (Tabela 9, figura 20).

4.8.6 IL-6

Nesta análise, as comparações entre os grupos mostraram diferenças significativas entre o grupo C x I (+6562%; p=0,0188). O grupo IE apresentou uma redução nos resultados quando comparado ao grupo I (- 93 %), no entanto sem significância.

4.8.7 IL-2

A produção de IL-2 foi muito maior no grupo I em comparação com o grupo C (+12082%; $p=0,0499$). Enquanto que o grupo IE, apresentou uma diminuição de 97% em relação ao grupo I, no entanto não significativamente (Tabela 9, figura 20).

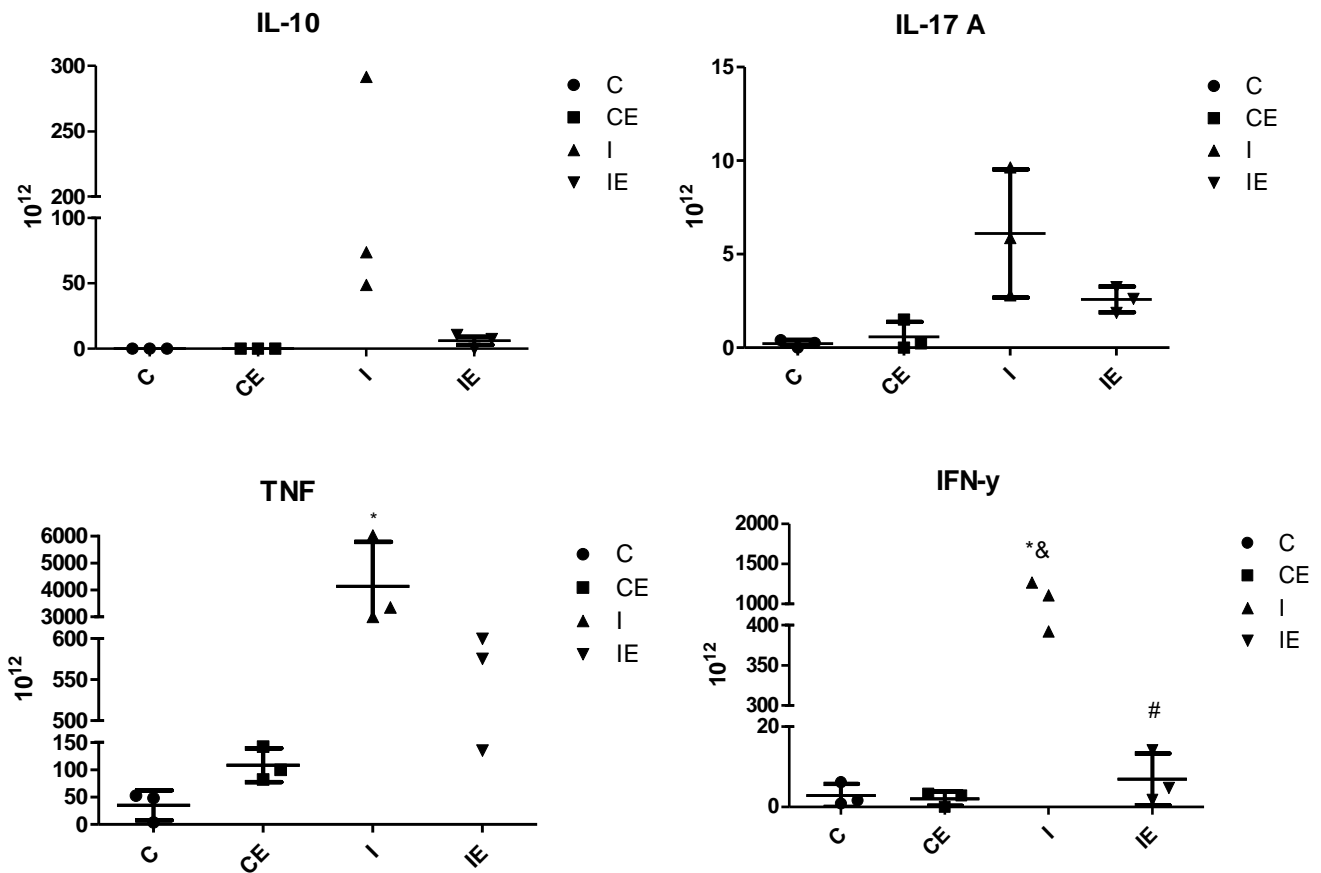
Tabela 9 – Dosagem de citocinas (pg/mL) produzidas por linfócitos do tecido esplênico de camundongos infectados ou não e submetidos à ingestão de etanol à 18% ou não, durante 28 dias consecutivos (média \pm desvio-padrão)

Citocinas	Grupos			
	C	CE	I	IE
IL-10	-	-	138 \pm 133	6,06 \pm 5,50
IL-17A	0,22 \pm 0,20	0,58 \pm 0,81	6,11 \pm 3,43	2,58 \pm 0,69
TNF	34,95 \pm 27,27	108 \pm 30	4130 \pm 1652*	436 \pm 261
IFN- γ	2,88 \pm 2,86	2,04 \pm 1,78	923 \pm 466	6,89 \pm 6,45
IL-4	1,32 \pm 0,71	2,87 \pm 2,59	28 \pm 25*	7,75 \pm 3,13
IL-6	14,29 \pm 9,77	51 \pm 18	952 \pm 624*	83 \pm 36
IL-2	4,17 \pm 3,31	5,89 \pm 5,94	508 \pm 117*	12,34 \pm 6,78

Legenda: C: Não infectado; CE: Não infectado com ingestão de etanol por 28 dias. I: Infectado; IE: Infectado com ingestão de etanol por 28 dias. (*): Diferença significativa ($p<0,05$) com o grupo C; (&) Diferença significativa ($p<0,05$) com o grupo CE; (#) Diferença significativa ($p<0,05$) com o grupo I.

Fonte: A autora, 2019.

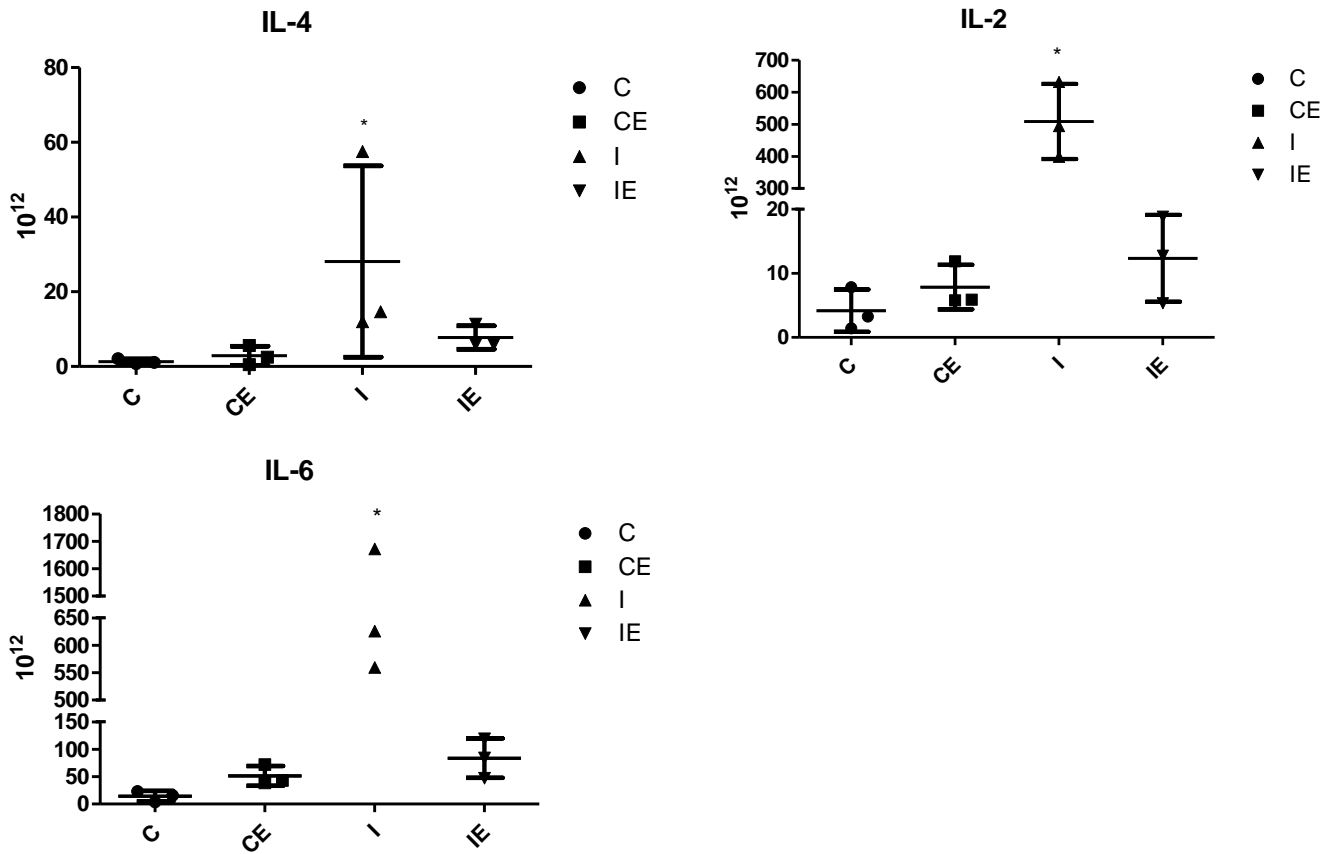
Figura 19 – Citocinas IL-10, IL-17A, TNF, IFN- γ (pg/mL) produzidas por linfócitos do tecido esplênico de camundongos infectados ou não e submetidos à ingestão de etanol à 18% ou não, durante 28 dias consecutivos (média \pm desvio-padrão)



Legenda: C: Não infectado; CE: Não infectado com ingestão de etanol por 28 dias. I: Infectado; IE: Infectado com ingestão de etanol por 28 dias. (*): Diferença significativa ($p < 0,05$) com o grupo C; (&) Diferença significativa ($p < 0,05$) com o grupo CE; (#) Diferença significativa ($p < 0,05$) com o grupo I.

Fonte: A autora, 2019

Figura 20 – Citocinas IL-6, IL-4 e IL-2 (pg/mL) produzidas por linfócitos do tecido esplênico de camundongos infectados ou não e submetidos à ingestão de etanol à 18% ou não, durante 28 dias consecutivos (média \pm desvio-padrão)



Legenda: C: Não infectado; CE: Não infectado com ingestão de etanol por 28 dias. I: Infectado; IE: Infectado com ingestão de etanol por 28 dias. (*): Diferença significativa ($p < 0,05$) com o grupo C; (&) Diferença significativa ($p < 0,05$) com o grupo CE; (#) Diferença significativa ($p < 0,05$) com o grupo I.

Fonte: A autora, 2019.

DISCUSSÃO

Estudos que avaliem a existência de parasitoses concomitantes a situações não infecciosas, são de extrema importância para entendermos as possíveis alterações na relação parasito-hospedeiro, decorrentes destas associações. Algumas alterações resultantes destas comorbidades, podem acarretar em mudanças morfológicas e fisiológicas ao parasito, melhorando ou comprometendo seu desenvolvimento e, conseqüentemente, amplificando ou minimizando seus danos ao hospedeiro (ALENCAR et al., 2009).

A esquistossomose mansônica, considerada uma das parasitoses mais importantes no Brasil e no mundo, é bastante estudada e tem boa parte do seu desenvolvimento bem definido. No entanto, sua associação com outras doenças não infecciosas (NEVES et al., 2001, 2007b; BRANDÃO-BEZERRA, 2016) precisa ser melhor explorada, principalmente, o impacto nos principais órgãos afetados por esta parasitose, quando expostos à estas circunstâncias.

O alcoolismo, considerado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma doença crônica e multifatorial, é amplamente difundido no mundo, atingindo pessoas de todas as classes sociais e acarretando em danos ao indivíduo, tanto no aspecto social, quanto fisiológico. A ingestão do etanol, presente nas bebidas alcoólicas, pode causar graves prejuízos à diversos órgãos, principalmente, ao fígado (PARK et al., 2006; NAGATA; SUZUKI; SAKAGUCHI, 2007b), além de comprometimento ao sistema imunológico (CREWS et al., 2006).

Estudos desempenhados em nosso grupo de pesquisa, associando a esquistossomose ao alcoolismo, já mostraram que a intensidade da infecção esquistossomótica foi alterada nos parâmetros parasitológicos e histopatológicos, acarretando em maiores danos ao fígado (BRANDÃO-BEZERRA, 2016).

Neste estudo, os resultados encontrados no grupo infectado com ingestão de etanol 18%, mostraram que o consumo de etanol a o aumento da massa corporal e da massa do baço, decorrentes da infecção esquistossomótica. O valor energético dos alimentos adicionado ao consumo de etanol, que também possui calorias, pode acarretar em ganho de peso, no entanto, estas respostas variam de indivíduo para indivíduo (KACHANI; BRASILIANO; HOCHGRAF, 2008). Diversos estudos demonstram que o abuso, agudo ou crônico da ingestão de etanol, pode produzir perda de linfócitos T e B no baço, timo, linfonodos (STARKENBURG; MUNROE; WALTENBAUGH, 2001; HEINZ; WALTENBAUGH, 2007; LANZKE et al., 2017) e no sangue (LIU, 1980; MEDINA-AVILA et al., 2015). O mecanismo dessas perdas celulares ainda não está muito bem esclarecido, no entanto, acredita-se que o

etanol tenha efeitos no processo de apoptose celular, de tal forma que o equilíbrio normal do aumento celular por divisão celular *versus* a perda celular por apoptose, possa ser perturbado (COOK, 1998; LANZKE et al., 2017), podendo acarretar inclusive em atrofia nestes órgãos. Corroborando com nossos resultados, um estudo experimental, onde ratos da linhagem Sprague-Dawley foram expostos ao etanol por inalação, mostrou que essa substância provocou perda de peso e, conseqüentemente, diminuição na massa dos órgãos devido ao stress metabólico gerado pelo seu consumo (LEE; KIM, 2017). Na infecção esquistossomótica o aumento da massa corporal deve-se ao aumento de órgãos como fígado (hepatomegalia) e baço (esplenomegalia) causados pela formação dos granulomas e, conseqüente, hipertensão portal, decorrentes desta parasitose (LENZI; SOBRAL; LENZI, 1987; COSTA-SILVA et al., 2002; NEVES et al., 2006; GÓES et al., 2012).

Os níveis de glicose nos animais do grupo infectado, grupo I, diminuíram em relação ao grupo controle. Estudo anterior, associando a diabetes e a esquistossomose mostrou uma diminuição nos níveis de glicose, devido aos helmintos adultos, que captam grandes quantidades destas moléculas do hospedeiro por difusão passiva, com auxílio de proteínas transportadoras de glicose espalhadas ao longo do seu tegumento (HULSTIJN et al., 2001, 2011). A metabolização do etanol no tecido hepático, acarreta em aumento no NADH, fazendo com que haja um desvio dos produtos da gliconeogênese para rotas alternativas, resultando em uma diminuição na síntese de glicose (SUMIDA; COGGER; MATVEYENKO, 2007). Este fato corrobora o resultado encontrado no grupo não infectado com ingestão de etanol, grupo CE, que apresentou diminuição nos níveis de glicose sérica. No entanto, diferentemente do que já é descrito sobre os níveis deste analito durante a infecção esquistossomótica, o grupo IE, não apresentou diminuição desses níveis.

A diminuição nos níveis de colesterol e HDL, decorrentes da infecção esquistossomótica encontradas neste estudo (grupos I e IE), são compatíveis com os achados da literatura, visto que o helminto depende dos lipídios, não só para sua nutrição, mas também os utiliza como mecanismo de defesa contra a resposta imune do hospedeiro (NEVES et al., 2006; TALLIMA; HAMADA; EL RIDI, 2007; SKELLY et al., 2014). Os lipídios induzem o parasito a expressar uma proteína de superfície que possuem receptores de colesterol circulante. Esta associação da proteína e colesterol protege e favorece o parasito contra a resposta imune do hospedeiro (NEVES et al., 2006, 2007a).

O grupo infectado com ingestão de etanol (IE), apresentou aumento nos níveis de colesterol e HDL, em relação ao grupo infectado, e como exposto anteriormente, este grupo também apresentou aumento nos níveis de glicose. Sugere-se que estes resultados sejam decorrentes das alterações encontradas no tegumento dos helmintos, causadas pela ingestão de

etanol (BRANDÃO-BEZERRA, 2016). Estes danos podem ter acarretado em menor captação da glicose e dos lipídios séricos, fazendo com que estes níveis retornem ao parâmetro normal.

Na infecção esquistossomótica, os ovos que chegam ao fígado, promovem danos induzindo à formação de granulomas, depósito de colágeno e a expansão de fibras no espaço portal e intra-hepático promovendo obstrução da veia porta (COSTA-SILVA et al., 2002; ALENCAR et al., 2009). Segundo SILVA, (2008) estas alterações no parênquima hepático decorrentes da infecção, induzem o aumento nos níveis das enzimas hepáticas TGO, TGP e γ -GT. Sabe-se que o fígado é o principal local de metabolização do etanol e esta exposição aumenta a produção celular de ROS, que são espécies reativas de oxigênio e de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (WALL; LUCZAK; HILLER-STURMHÖFEL, 2016). Quando as defesas antioxidantes se tornam sobrecarregadas, a viabilidade do hepatócito diminui e ocorre dano hepático (BORINI; GUIMARÃES, 1999; DIEHL et al., 2005). CARVALHO, (2004) não encontrou alterações significativas no TGO e TGP em um estudo sobre os parâmetros de enzimas hepáticas em camundongos Balb/c esquistossomóticos. Assim como nossos resultados, que também não apontaram diferenças significativas destas enzimas, mesmo em associação com a ingestão de etanol. Somente a albumina, que é uma proteína plasmática sintetizada no fígado (SANTOS et al., 2016), apresentou aumento significativo no grupo IE provavelmente, indicando algum dano decorrente tanto das alterações ao tecido hepático causados pela infecção (CHEEVER et al., 2002; COUTO et al., 2007), quanto pela ingestão de etanol (ARAUJO; WORMAN, 2015; LEE; KIM, 2017).

Os neutrófilos são células componentes do granuloma esquistossomótico, sendo as primeiras a chegarem aos ovos (NATHAN, 2006) e contribuem para o dano tecidual devido a produção de mediadores citotóxicos e espécies reativas de oxigênio (CASCÃO et al., 2010). No entanto, sua presença é maior em infecções por *Schistosoma japonicum* (CASTRO, 2016). Na análise do leucograma, no grupo IE, houve aumento significativo no número de bastões, que são neutrófilos jovens. Estas células são estimuladas principalmente por IL-17 produzido pelas células Th17, durante a resposta imune inata (RUTITZKY; STADECKER, 2011; NORMANTON; MARTI, 2013). Os níveis desta citocina foram altos no grupo infectado. No entanto, no grupo IE, esta citocina apresentou redução, podendo explicar o aumento significativo deste tipo celular no sangue. Sugere-se que, devido ao baixo nível de IL-17 neste grupo, o estímulo gerado por esta citocina seja insuficiente para a ativação normal deste tipo celular até os locais dos ovos dos helmintos, para a formação dos granulomas.

A estereologia abrange técnicas cada vez mais utilizadas para análises quantitativas dos danos teciduais em estudos científicos, pois permite relacionar os parâmetros tridimensionais (3D) das estruturas, a partir das medidas realizadas em duas dimensões (2D),

representando mais precisamente a situação real da estrutura em estudo (MANDARIM-DE-LACERDA, 2003; NEVES et al., 2006; KARISE et al., 2017). Através desta técnica, em conjunto com a análise histopatológica (qualitativa) e com a morfometria, pode-se avaliar e mensurar as importantes alterações no tecido esplênico que ocorreram decorrentes da infecção esquistossomótica associada ao consumo de etanol.

No baço, os cordões esplênicos presentes na polpa vermelha, dão o sustento estrutural ao órgão e são compostos por fibras reticulares (colágeno tipo III), elastina e outras proteínas, células reticulares e macrófagos associados, assim como na polpa branca, onde também há camadas de fibras e células reticulares achatadas (SAITO et al., 1988; CESTA, 2006).

A desorganização estrutural, como a “dismorfia” da polpa branca, encontrada na análise histopatológica nos grupos com etanol (CE e IE) podem ser explicadas devido à fragilidade e diminuição das fibras reticulares encontradas nos tecidos. A análise morfológica do grupo IE também apresentou alteração nesta estrutura, com aumento na área e perímetro, diferentemente do que é abordado em alguns trabalhos, onde se observou atrofia na polpa branca dos animais infectados (ANDRADE, 1965; FREITAS et al., 1999; DA SILVA et al., 2012). Propõe-se que, devido à diminuição e fragilidade das fibras reticulares, causadas pela ação do etanol neste tecido, a desorganização estrutural decorrente da infecção esquistossomótica, seja ainda mais intensa. Em alguns campos no parênquima esplênico dos animais do grupo IE, as polpas brancas, aparentavam estar em confluência, acarretando no aumento da sua área. Sugere-se que a ação do etanol contribua para a fragilidade e diminuição destas fibras, prejudicando a estrutura (GOPINATH et al., 2014) ou o metabolismo do colágeno (DONEJKO et al., 2015) que é o principal componente destas.

Sugere-se também, que o aumento das estruturas trabeculares visto em todos os grupos, na análise histopatológica e estereológica em relação ao grupo controle, porém somente no grupo CE significativamente, tenha ocorrido devido à necessidade de uma maior sustentação ao órgão em decorrência dos danos (COUTO et al., 2007) e desorganização estrutural causados pela infecção por *S. mansoni* e ação da ingestão de etanol.

O baço é um sítio de hematopoiese no período fetal e neonatal em camundongos (CESTA, 2006; SUTTIE, 2006). Todavia, em casos de agravo hematotóxico, anemias e infecções, durante a fase adulta, ele pode desempenhar essa função de hematopoiese extramedular, apresentando células progenitoras de linhagens mielocítica, linfocítica, eritroblastos e megacariócitos (NAVEIRA et al., 1967; DA SILVA et al., 2012; WILCOX, 2016). Além deste fato, o sequestro esplênico de plaquetas, comum na esquistossomose, também aumenta a demanda de megacariócitos (PETROIANU; OLIVEIRA; ALBERTI,

2004; MARTINS et al., 2010), confirmando o aumento deste tipo celular encontrado em todos os grupos em relação ao controle.

A fase aguda pré-patente da infecção é caracterizada pela resposta imunológica, predominantemente, do tipo Th-1, na qual ocorre a produção de citocinas pró-inflamatórias incluindo interferon gama (IFN- γ), IL-1, IL-2, IL-6 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (DUNNE; COOKE, 2005; PEARCE et al., 2004; PEARCE; MACDONALD, 2002b; WILSON et al., 2007).

As citocinas produzidas pelos macrófagos dosadas neste trabalho (TNF, IFN- γ e IL-6), apontam para um perfil mais inflamatório, levando-se em consideração a ausência de IL-10 (citocina anti-inflamatória) nos grupos. A quimiocina MCP-1, um potente quimiotático e ativador de monócitos, linfócitos T, células NK, e eosinófilos (OLIVEIRA et al., 2011) também estava presente no grupo infectado, e em menor quantidade no grupo infectado com ingestão de etanol.

Os resultados das citocinas produzidas por linfócitos dosadas neste trabalho (IL-10, IL-17, TNF, IFN- γ , IL-4, IL-6 e IL-2), indicam um perfil de resposta imunológica do tipo 1 e tipo 2 (perfil misto) nos grupos de estudo.

Estas citocinas possuem papéis muito importantes no decurso da infecção esquistossomótica. A citocina IL-17 recebeu considerável atenção como um novo mediador pró-inflamatório associado à inflamação crônica e doença auto-imune mediada por células (RUTITZKY; STADECKER, 2006). Níveis elevados desta citocina foram detectados em camundongos CBA infectados por *S mansoni*, tendo suas lesões reduzidas após o tratamento com anticorpos anti-IL-17 neutralizantes (RUTITZKY; ROSA; STADECKER, 2005). Outra pesquisa com animais esquistossomóticos deficientes em IL-17 e IFN- γ , indicaram que a imunopatologia grave na esquistossomose murina é conduzida, principalmente, por IL-17 e regulado pela produção IFN- γ (RUTITZKY; STADECKER, 2011). Camundongos deficientes na produção de eosinófilos durante a infecção esquistossomótica apresentaram uma redução significativa na concentração de citocinas do perfil Th2, entre elas IL-33, IL-5 e IL-13, das citocinas regulatórias IL-10 e TGF- β , e também IL-17 em relação aos animais infectados não deficientes, enquanto que os níveis de citocinas de perfil Th1, TNF- α e INF- γ , foram significativamente maiores (CASTRO, 2016).

Concentrações elevadas do marcador IL-6 foram detectados no sangue periférico de indivíduos com carga parasitária de *S mansoni* extremamente baixa, indicando a presença de um processo ativo inflamatório (CASTRO, 2016). Já a citocina TNF participa da formação do granuloma e também da formação de fibrose, por meio do recrutamento e estimulação de fibroblastos (SILVA et al., 2017 ;CASTRO et al., 2018).

Em nosso estudo, os resultados das citocinas pró-inflamatórias no grupo infectado foram bem elevados, demonstrando uma importante resposta inflamatória aos estímulos causados pela infecção esquistossomótica. Porém, no grupo IE, todos os resultados dessas citocinas diminuíram drasticamente.

Na literatura, algumas informações sobre etanol e as citocinas pró-inflamatórias divergem com nossos achados. Segundo TEIXEIRA et al., (2016), a ingestão prolongada de etanol resulta em aumento na produção de TNF- α por macrófagos e ativação da cascata inflamatória. Na hepatite alcoólica, os níveis de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 e IL-6, são altamente elevados. Os níveis mais altos de TNF- α foram correlacionados com disfunção hepática. Concentrações aumentadas de TNF e IL-6, bem como uma diminuição nos níveis de IL-10, IFN- γ e IL-2 têm sido comumente ligadas a pacientes com cirrose decorrente de DHA (ROMEO et al., 2007).

Na fase pós-patente que, comumente, tem seu início em torno de 45 dias após a infecção, (fase deste estudo) ocorre uma mudança no perfil dos mediadores imunológicos produzidos pelo hospedeiro, ocorrendo o aumento de produção de citocinas do tipo Th2, como IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, eosinofilia e a produção de IgE, devido a produção de ovos pelo helminto (BURKE et al., 2009; HAMS; AVIELLO; FALLON, 2013).

A importância de citocinas do tipo Th2 na formação dos granulomas já foi, experimentalmente, demonstrada. Em camundongos ‘triplo knockout’ deficientes na produção de IL-10, IL-12/23 (p40) e IL-13R α 2, ocorreu formação de granulomas, exacerbadamente, maiores do que os controles (MENTINK-KANE et al., 2011). Camundongos geneticamente deficientes em STAT 6 (sinal transdutor e ativador de transcrição 6 essencial para a progressão da resposta Th2) e animais tratados com anti-IL-4 apresentaram redução no tamanho dos granulomas (KAPLAN et al., 1998). Por outro lado, pesquisas anteriores mostraram que camundongos geneticamente deficientes na produção de IL-4 e infectados pelo *S. mansoni* apresentaram aumento na mortalidade e morbidade, que foram consideradas decorrentes ao aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, IFN- γ , TNF- α e NO (FALLON et al., 2000; LA FLAMME; PATTON; PEARCE, 2001). Sendo assim, o balanço da resposta Th1/Th2 que resulta na formação do granuloma, que é a causa da patologia devido à fibrose, antagonicamente, pode proporcionar proteção, minimizando os danos teciduais causados pela resposta imune a infecção por *S. mansoni* (BOYETT; HSIEH, 2014).

Em nosso estudo, as citocinas do tipo Th2, IL-4 e IL-10 se mostraram aumentadas no grupo infectado, no entanto, a associação da infecção ao consumo de etanol, assim como nas citocinas pró-inflamatórias, reduziu essa produção, atuando como um imunossupressor. TEIXEIRA et al., (2016) relatou níveis diminuídos de IL-4, IL-5, IL-13 e IgE, devido ao

desvio da resposta Th2 para Th1 em alcoólatras crônicos hiperinfectados pelo *Strongyloides stercoralis*, agravando a doença. Outros estudos, no entanto, afirmam que o consumo de álcool diminui a produção de citocinas Th1, mantendo a produção de citocinas Th2 em níveis normais ou até aumentados (ZAGO-GOMES et al., 2002).

Foi demonstrado em pesquisa associando a infecção esquistossomótica durante a fase aguda e a desnutrição que, os camundongos desnutridos e infectados, apresentaram resposta indicativa de perfil Th1, com intensa produção de IFN- γ e baixa produção de IL-13 e sem detecção de IL-4, enquanto que os eutróficos apresentaram resposta indicativa de perfil Th2 (SILVA, 2008). A co-infecção de *S. stercoralis* e vírus linfotrópico T humano tipo 1 (HTLV-1) demonstrou aumento da produção de IFN- γ e diminuição dos níveis de IL-4, IL-5 e IL-13 (PORTO et al., 2002; SANTOS et al., 2004; SILVA et al., 2016).

Alguns autores sugerem que diminuição destas respostas nos grupos com ingestão de etanol, decorrem de uma diminuição da capacidade proliferativa de linfócitos T, decréscimo na produção de anticorpos, alteração no perfil das citocinas, além de mudanças fenotípicas e funcionais em populações celulares de órgãos linfoides (PRUETT; FAN, 2009; LANZKE et al., 2007, 2017 PASCUAL et al., 2017).

Em resumo, não houve prevalectimento no tipo de resposta imune (Th1 ou Th2) nesta associação, porém podemos afirmar que o etanol, devido a diminuição nos níveis das citocinas dosadas, imunossuprimiu a resposta inflamatória e anti-inflamatória gerada pela infecção esquistossomótica. BRANDÃO-BEZERRA, (2016) em seu estudo associando a infecção esquistossomótica e a ingestão de etanol, encontrou aumento na área dos granulomas esquistossomóticos e diminuição na deposição de colágeno, que comprometeram ainda mais o tecido hepático. Os resultados encontrados neste trabalho sobre as citocinas, podem explicar estas alterações citadas, repercutindo em maiores danos ao hospedeiro.

CONCLUSÃO

Concluiu-se neste trabalho, que a ingestão de etanol modificou o padrão de algumas alterações decorrentes da infecção esquistossomótica como:

- a) Atenuou a diminuição dos níveis de glicose e lipídios séricos comuns na infecção esquistossomótica;
- b) Tornou mais intensa a desestruturação organizacional no tecido esplênico que ocorre na esquistossomose;
- c) Reduziu os níveis das citocinas produzidas por linfócitos, dosadas neste trabalho, durante a infecção esquistossomótica.

REFERÊNCIAS

- ABDALA, R. Caracterização da resposta imune celular de pacientes portadores da esquistossomose mansônica residentes em áreas endêmicas para doença. [s.l.] Fundação Oswaldo Cruz Centro, 2012.
- ALENCAR, A. C. DE B. M. et al. High fat diet has a prominent effect upon the course of chronic schistosomiasis mansoni in mice. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, n. 4, p. 608–613, 2009.
- ALENCAR, A. C. M. DE B. et al. Simvastatin and artesunate impact the structural organization of adult *Schistosoma mansoni* in hypercholesterolemic mice. *Experimental Parasitology*, v. 167, p. 115–123, 2016.
- ANDRADE, Z. A. Hepatic Schistosomiasis. Morphological aspects. *Progress in liver diseases*, v. 2, p. 228–42, 1965.
- ARAUJO, J. L.; WORMAN, H. J. Acute liver injury associated with a newer formulation of the herbal weight loss supplement Hydroxycut. *BMJ case reports*, v. 2015, 6 maio 2015.
- BAIN, B. J. Células sanguíneas: um guia prático. 5^o Ed. Artmed; 2016.
- BALOGH, P.; HORVÁTH, G.; SZAKAL, A. K. Immunoarchitecture of Distinct Reticular Fibroblastic Domains in the White Pulp of Mouse Spleen. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, v. 52, n. 10, p. 1287–1298, 2004.
- BATISTA, J. J. et al. Expressão gênica de caspases 3 e 8 em timo e baço de ratas recém-desmamadas e imunossuprimidas por glicocorticóide. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 57, n. 4, p. 457–464, 2005.
- BEZERRA, F. S. M. et al. Evaluating a point-of-care circulating cathodic antigen test (POC-CCA) to detect *Schistosoma mansoni* infections in a low endemic area in north-eastern Brazil. *Acta tropica*, v. 182, p. 264–270, jun. 2018.
- BICA, I.; HAMER, D. H.; STADECKER, M. J. HEPATIC SCHISTOSOMIASIS. *Infectious Disease Clinics of North America*, v. 14, n. 3, p. 583–604, 1 set. 2000.
- BINA, J. C.; PRATA, A. Esquistossomose na área hiperendêmica de Taquarendi: I Infecção pelo *Schistosoma mansoni* e formas graves. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 36, n. 2, p. 211–216, abr. 2003.
- BORINI, P.; GUIMARÃES, R. C. Liver synthesis function in chronic asymptomatic or oligosymptomatic alcoholics: correlation with other liver tests. *Revista do Hospital das Clínicas*, v. 54, n. 3, p. 97–102, 1999.
- BOYETT, D.; HSIEH, M. H. Wormholes in host defense: how helminths manipulate host tissues to survive and reproduce. *PLoS pathogens*, v. 10, n. 4, p. e1004014, abr. 2014.
- BRANDÃO-BEZERRA, L. Efeito da ingestão de etanol na infecção esquistossomótica murina experimental. [s.l.] UERJ, 2016.

BRASIL. Vigilância da Esquistossomose Mansoni - Diretrizes técnicas, 2014.

BRASIL, M. DA S. PLANO INTEGRADO DE AÇÕES ESTRATÉGICAS DE ELIMINAÇÃO DA HANSENÍASE, FILARIOSE, ESQUISTOSSOMOSE E ONCOCERCOSSE COMO PROBLEMA DE SAÚDE PÚBLICA, TRACOMA COMO CAUSA DE CEGUEIRA E CONTROLE DAS GEOHELMINTÍASES, 2013. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/plano_integrado_acoes_estrategicas_hanseniose.pdf>. Acesso em: 24 jan. 2019

BRASIL, M. DA S. Número de casos confirmados de esquistossomose em área não-endêmica.[s.l:s.n.]. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/janeiro/25/Numero-de-casos-de-esquistossomose-na-area-nao-endemica-2017.pdf>>. Acesso em: 25 jan. 2019.

BURKE, M. L. et al. Immunopathogenesis of human schistosomiasis. *Parasite Immunology*, v. 31, n. 4, p. 163–176, abr. 2009.

BUTTERWORTH, A. E. et al. Immunity and morbidity in human schistosomiasis mansoni. *Tropical and geographical medicine*, v. 46, n. 4 Spec No, p. 197–208, 1994.

CANDIDO, R. R. F. et al. Evaluation of the immunogenicity of *Schistosoma mansoni* egg surface. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 50, n. 5, p. 652–657, 2017.

CAPRON, A.; DESSAINT, J. P. Effector and Regulatory Mechanisms in Immunity to Schistosomes: A Heuristic View. *Annual Review of Immunology*, v. 3, n. 1, p. 455–476, 28 abr. 1985.

CARVALHO, S. L. Fibrose e outras lesões hepáticas em camundongos isogênicos (“inbred”) desnutridos e eutróficos, infectados com *Schistosoma mansoni*. p. 1–64, 2004.

CASCÃO, R. et al. Identification of a cytokine network sustaining neutrophil and Th17 activation in untreated early rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy*, v. 12, n. 5, p. R196, 2010.

CASTRO, V. N. DE. Perfil de citocinas e quimiocinas no sangue periférico de indivíduos com carga parasitária baixa na infecção pelo *Schistosoma mansoni*. [s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais, 2016.

CASTRO, L. P. F. et al. The effect of chronic ingestion of ethanol on modulation of granulomatous inflammation in experimental schistosomiasis in mice. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 1993.

CASTRO, V. N. et al. Systemic Cytokine and Chemokine Profiles in Individuals With *Schistosoma mansoni* Infection and Low Parasite Burden. *Frontiers in immunology*, v. 9, p. 2975, 2018.

CESTA, M. F. Normal Structure, Function, and Histology of the Spleen. *Toxicologic Pathology*, v. 34, p. 455–465, 2006.

CHEEVER, A. W. et al. Experimental models of *Schistosoma mansoni* infection. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 97, n. 7, p. 917–940, 2002.

- COELHO, P. M. Z. et al. Use of a saline gradient for the diagnosis of schistosomiasis. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, n. 5, p. 720–3, ago. 2009.
- COLLEY, D. G. et al. A Five-Country Evaluation of a Point-of-Care Circulating Cathodic Antigen Urine Assay for the Prevalence of *Schistosoma mansoni*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 88, n. 3, p. 426–432, 2013.
- COOK, R. T. Alcohol abuse, alcoholism, and damage to the immune system - A review. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, v. 22, n. 9, p. 1927–1942, 1998.
- CORREIA, M. C. B. et al. Platelet function and the von Willebrand factor antigen in the hepatosplenic form of schistosomiasis mansoni. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 103, n. 10, p. 1053–1058, 2009.
- COSTA-SILVA, M. et al. Natural *Schistosoma mansoni* infection in *Nectomys squamipes*: Histopathological and morphometric analysis in comparison to experimentally infected *N. squamipes* and C3H/He mice. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 97, n. SUPPL. 1, p. 129–142, 2002.
- COUTINHO, E. DE M. *Schistosoma mansoni* e esquistossomose: uma visão multidisciplinar- Patologia da Esquistossomíase na Má-Nutrição: uma visão abrangente | 655, 2008.
- COUTINHO, E. M. et al. Liver and serum soluble protein changes and pathomorphology in undernourished mice with acute schistosomiasis mansoni. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 24, n. 4, p. 235–43, 1991.
- COUTINHO, E. M. et al. Host nutritional status as a contributory factor to the remodeling of schistosomal hepatic fibrosis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 98, n. 7, p. 919–925, out. 2003.
- COUTINHO, E. M. et al. Manson ' s schistosomiasis in the undernourished mouse : some recent findings. v. 105, n. June, p. 359–366, 2010.
- COUTO, R. J. et al. Esquistossomose murina associada à desnutrição: alterações histopatológicas no fígado, baço e jejuno. *REVISTA DE PATOLOGIA TROPICA*, 2007.
- CREWS, F. T. et al. Cytokines and Alcohol. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, v. 30, n. 4, p. 720–730, 1 abr. 2006.
- DA SILVA, A. M. et al. A high-fat diet associated with acute schistosomiasis mansoni causes disorganization in splenic architecture in mice. *Experimental Parasitology*, v. 132, n. 2, p. 193–199, 2012.
- DIEHL, A. M. et al. Cytokines and the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Gut*, v. 54, n. 2, p. 303–6, fev. 2005.
- DKHIL, M. A. et al. Effect of gold nanoparticles on mice splenomegaly induced by schistosomiasis mansoni. *Saudi Journal of Biological Sciences*, v. 24, n. 6, p. 1418–1423, 2017.
- DOENHOFF, M. J. et al. An anti-atherogenic effect of *Schistosoma mansoni* infections in mice associated with a parasite-induced lowering of blood total cholesterol. *Parasitology*, v. 125, n. Pt 5, p. 415–21, nov. 2002.

DOLGANIUC, A. et al. Additive Inhibition of Dendritic Cell Allostimulatory Capacity by Alcohol and Hepatitis C Is Not Restored by DC Maturation and Involves Abnormal IL-10 and IL-2 Induction. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, v. 27, n. 6, p. 1023–1031, 1 jun. 2006.

DONEJKO, M. et al. Hyaluronic acid abrogates ethanol-dependent inhibition of collagen biosynthesis in cultured human fibroblasts *Drug Design, Development and Therapy*. [s.l.] Dove Press, 24 nov. 2015. Disponível em: <<https://www.dovepress.com/hyaluronic-acid-abrogates-ethanol-dependent-inhibition-of-collagen-bio-peer-reviewed-article-DDDT>>. Acesso em: 25 jan. 2019.

DOSSI, A. C. S. Níveis de IgG anti-leishmania e perfil de citocinas em cães machos e fêmeas assintomáticos naturalmente infectados por leishmania (L.) Chagasi. [s.l.] Universidade Estadual Paulista, 2006.

DRUMMOND, S. C. Schistosoma mansoni: Plaquetopenia como marcador de esquistossomose hepatoesplênica em área endêmica do nordeste de Minas Gerais, Brasil. [s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais para, 2014.

DUAN, Q. et al. SC Department of Social Medicine and Health Administration , Xiangya School of Public. *Acta Tropica*, 2018.

DUNNE, D. W.; COOKE, A. A worm's eye view of the immune system: consequences for evolution of human autoimmune disease. *Nature Reviews Immunology*, v. 5, n. 5, p. 420–426, 1 maio 2005.

ENK, M. J.; OLIVEIRA E SILVA, G.; RODRIGUES, N. B. Diagnostic Accuracy and Applicability of a PCR System for the Detection of Schistosoma mansoni DNA in Human Urine Samples from an Endemic Area. *PLoS ONE*, v. 7, n. 6, p. 38947, 2012.

FALLON, P. G. et al. Schistosome infection of transgenic mice defines distinct and contrasting pathogenic roles for IL-4 and IL-13: IL-13 is a profibrotic agent. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, v. 164, n. 5, p. 2585–91, 1 mar. 2000.

FERREIRA, F. T. et al. Sensitivity and specificity of the circulating cathodic antigen rapid urine test in the diagnosis of schistosomiasis mansoni infection and evaluation of morbidity in a low-endemic area in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 50, n. 3, p. 358–364, 2017.

FILOMENO, C. E. DA S. Inter-relação entre a esquistossomose mansoni e a síndrome metabólica no. [s.l.] Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2017.

FREITAS, C. R. et al. Pathology of the Spleen in Hepatosplenic Schistosomiasis. Morphometric Evaluation and Extracellular Matrix Changes. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 94, n. 6, p. 815–822, 1999.

GÓES, V. C. et al. Effects of high-fat chow on heart tissue in acute and chronic experimental murine schistosomiasis mansoni. *Parasitology*, v. 139, n. 11, p. 1462–1470, 2012.

GÓES, V. C. et al. Streptozotocin (STZ) and schistosomiasis mansoni change the biodistribution of radiopharmaceutical sodium 99m Tc-pertechnetate in mice. *Nuclear*

Medicine and Biology, v. 43, n. 9, p. 581–586, set. 2016.

GOMES, A. C. Alterações no tecido esplênico de camundongos esquistossomóticos com desnutrição calórica e protéica induzida no período de lactação. [s.l.] Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2013.

GOPINATH, A. et al. Effect of aqueous ethanol on the triple helical structure of collagen. *European Biophysics Journal*, v. 43, n. 12, p. 643–652, 7 dez. 2014.

GRENFELL, R. F. Q. et al. *Schistosoma mansoni* in a low-prevalence area in Brazil: the importance of additional methods for the diagnosis of hard-to-detect individual carriers by low-cost immunological assays. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 108, n. 3, p. 328–334, maio 2013.

HAMS, E.; AVIELLO, G.; FALLON, P. G. The schistosoma granuloma: friend or foe? *Frontiers in immunology*, v. 4, p. 89, 2013.

HEINZ, R.; WALTENBAUGH, C. Ethanol Consumption Modifies Dendritic Cell Antigen Presentation in Mice. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, v. 31, n. 10, p. 1759–1771, out. 2007.

HIATT, R. A. et al. Factors in the pathogenesis of acute schistosomiasis mansoni. *The Journal of infectious diseases*, v. 139, n. 6, p. 659–666, jun. 1979.

HOFFMANN, K. F.; CHEEVER, A. W.; WYNN, T. A. IL-10 and the dangers of immune polarization: excessive type 1 and type 2 cytokine responses induce distinct forms of lethal immunopathology in murine schistosomiasis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, v. 164, n. 12, p. 6406–16, 15 jun. 2000.

HULSTIJN, M. et al. Lower faecal egg excretion in chemically-induced diabetic mice infected with *Schistosoma mansoni* due to impaired egg maturation. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 96, n. 3, p. 393–396, abr. 2001.

HUSSAARTS, L. et al. Chronic helminth infection and helminth-derived egg antigens promote adipose tissue M2 macrophages and improve insulin sensitivity in obese mice. *The FASEB Journal*, v. 29, n. 7, p. 3027–3039, 7 jul. 2015.

INÁCIA GOMES, L. et al. Development and Evaluation of a Sensitive PCR-ELISA System for Detection of *Schistosoma* Infection in Feces. *PLOS Neglected Tropical Disease*, v. 4, n. 4, p. 8, 2010.

KACHANI, A. T.; BRASILIANO, S.; HOCHGRAF, P. B. O impacto do consumo alcoólico no ganho de peso. *Revista de Psiquiatria Clínica*, v. 35, n. SUPPL. 1, p. 21–24, 2008.

KAPLAN, M. H. et al. Th2 Cells Are Required for the *Schistosoma mansoni* Egg-Induced Granulomatous Response. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, v. 158, n. 9, p. 4129–36, 1 maio 1998.

KARISE, I. et al. Liver and Metformin: Lessons of a fructose diet in mice. *Biochimie open*, v. 4, p. 19–30, jun. 2017.

KASTNER, M. R. Q. DE et al. Estudo morfológico do *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 encontrado na espécie humana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 9, n.

5, p. 247–261, 1975.

KATZ, N. Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose mansoni e Geohelminthoses. p. 90, 2018.

KATZ, N.; CHAVES, A.; PELLEGRINO, J. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in Schistosomiasis mansoni. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, v. 14, n. 6, p. 397–400, 1972.

KONGS, A. et al. The unreliability of the Kato-Katz technique limits its usefulness for evaluating *S. mansoni* infections. *Tropical medicine & international health : TM & IH*, v. 6, n. 3, p. 163–9, mar. 2001.

LA FLAMME, A. C.; PATTON, E. A.; PEARCE, E. J. Role of gamma interferon in the pathogenesis of severe schistosomiasis in interleukin-4-deficient mice. *Infection and immunity*, v. 69, n. 12, p. 7445–52, dez. 2001.

LAMBERTUCCI, J. R. Acute schistosomiasis mansoni : revisited and reconsidered. v. 105, n. July, p. 422–435, 2010.

LANZKE, N. et al. Differential effects of ethanol on IFN-gamma - and TNF-alfa-producing splenic T lymphocytes in a murine model of gram-negative pneumonia. *Addiction Biology*, v. 12, n. 1, p. 59–68, mar. 2007.

LANZKE, N. et al. Ethanol-Induced Alterations of T Cells and Cytokines after Surgery in a Murine Infection Model. v. 2017, 2017.

LEE, M. J.; KIM, H. Y. A 90-day inhalation toxicity study of ethyl formate in rats. *Toxicological Research*, v. 33, n. 4, p. 333–342, 2017.

LEITE, M. G. P. et al. Irrigation canals in Melo creek basin (Rio Espera and Capela Nova municipalities, Minas Gerais, Brazil): habitats to *Biomphalaria* (Gastropoda: Planorbidae) and potential spread of schistosomiasis. *Brazilian Journal of Biology*, v. 76, n. 3, p. 638–644, 2016.

LENZI, H. L. et al. Histoarchitecture of Schistosomal Granuloma Development and Involution: Morphogenetic and Biomechanical Approaches. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 93 SUPPL., n. Mariano 1995, p. 141–151, 1998.

LENZI, H. L.; SOBRAL, A. C.; LENZI, J. A. "In vivo" kinetics of eosinophils and mast cells in experimental murine schistosomiasis. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 82 Suppl 4, p. 67–76, 1987.

LINS, R. A. B. et al. Distribution of eosinophils at different stages of hepatic granuloma evolution in mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 41, n. 2, p. 173–178, 2008.

LIU, Y. K. Effects of alcohol on granulocytes and lymphocytes. *Seminars in hematology*, v. 17, n. 2, p. 130–6, abr. 1980.

MACHADO E SILVA, J. R.; NEVES, R. H.; GOMES, D. C. *Schistosoma mansoni* e esquistossomose: uma visão multidisciplinar; Capítulo II Filogenia, Co-Evolução, Aspectos Morfológicos e Biológicos das Diferentes Fases de Desenvolvimento do *Schistosoma mansoni*. Rio de Janeiro, 2008.

MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Stereological tools in biomedical research. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 75, n. 4, p. 469–486, 2003.

MANDREKAR, P. et al. Inhibition of Myeloid Dendritic Cell Accessory Cell Function and Induction of T Cell Anergy by Alcohol Correlates with Decreased IL-12 Production. *Journal of immunology*, v. 160, n. 9, p. 4587–95, 1 maio 2004.

MANGUEIRA, S. DE O. et al. Promoção Da Saúde E Políticas Públicas Do Álcool No Brasil: Revisão Integrativa Da Literatura. *Psicologia & Sociedade*, v. 27, n. 1, p. 157–168, 2015.

MARCHIORI, C. H. [First occurrence of *Biomphalaria straminea* in the South Goiano, Brazil]. *Revista de saúde pública*, v. 33, n. 6, p. 622–3, dez. 1999.

MARQUES, C. C. et al. Alcoholism and *Strongyloides stercoralis*: daily ethanol ingestion has a positive correlation with the frequency of *Strongyloides* larvae in the stools. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 4, n. 6, p. e717, 22 jun. 2010.

MARQUES, R. G. et al. Importância da preservação de tecido esplênico para a fagocitose bacteriana. *Acta Cirurgica Brasileira*, v. 17, n. 6, 2002.

MARTINS-MELO, F. R. et al. Spatiotemporal Patterns of Schistosomiasis-Related Deaths, Brazil, 2000–2011. *Emerging Infectious Disease*, 2015.

MARTINS, R. N. et al. Correlação entre esplenomegalia e plaquetopenia na forma hepatoesplênica da esquistossomose mansônica. *ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)*, v. 23, n. 4, p. 254–258, dez. 2010.

MCMANUS, D. P. et al. Schistosomiasis. *Nature Reviews*, p. 1–19, 2018.

MEBIUS, R. E.; KRAAL, G. Structure and function of the spleen. *Nature Reviews Immunology*, v. 5, n. 8, p. 606–616, 2005.

MEDINA-AVILA, Z. et al. Peripheral Blood Lymphocytes and Blood Tests are Modified according to the Alcohol Consumption Pattern in Young People. *GISAH: Global Information System on Alcohol and Health*, v. 3, n. 2, p. 1017, 2015.

MENTINK-KANE, M. M. et al. Accelerated and progressive and lethal liver fibrosis in mice that lack interleukin (IL)-10, IL-12p40, and IL-13R α 2. *Gastroenterology*, v. 141, n. 6, p. 2200–9, dez. 2011.

MOLINARO, E. M.; CAPUTO, L. F. G.; AMENDOEIRA, M. R. R. *Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde. Volume 2; EPSJV, IOC, 2010.*

MULLER, E. et al. Effects on the neutral lipid contents of the liver, ileum and serum during experimental schistosomiasis. *International Journal for Parasitology*, v. 31, n. 3, p. 285–287, 1 mar. 2001.

MUSTAFA, R.; BLUMENTHAL, E. Immunomodulatory effects of turmeric: Proliferation of spleen cells in mice. v. 1819, n. August, 2016.

- NAGATA, K.; SUZUKI, H.; SAKAGUCHI, S. Common pathogenic mechanism in development progression of liver injury caused by non-alcoholic or alcoholic steatohepatitis. *The Journal of Toxicological Sciences*, v. 32, n. 5, p. 453–468, 2007.
- NATHAN, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nature Reviews Immunology*, v. 6, n. 3, p. 173–182, 17 mar. 2006.
- NAVEIRA, J. B. et al. Study of the megakaryocyte system in hepato-splenic schistosomiasis. *Revista brasileira de medicina*, v. 24, n. 9, p. 724–7, set. 1967.
- NEVES, R. H. et al. Morphological aspects of *Schistosoma mansoni* adult worms isolated from nourished and undernourished mice: a comparative analysis by confocal laser scanning microscopy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 96, n. 7, p. 1013–1016, out. 2001.
- NEVES, R. H. et al. Phenotypic plasticity in adult worms of *Schistosoma mansoni* (Trematoda:Schistosomatidae) evidenced by Brightfield and confocal laser scanning microscopies. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 99, n. 2, p. 131–136, 2004.
- NEVES, R. H. et al. Hepatic stereology of schistosomiasis mansoni infected-mice fed a high-fat diet. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 101, n. SUPPL. 1, p. 253–260, 2006.
- NEVES, R. H. et al. Light and confocal microscopic observations of adult *Schistosoma mansoni* from mice fed on a high-fat diet. *Journal of helminthology*, v. 81, n. 4, p. 361–368, 2007a.
- NOLTE, M. A. et al. The strict regulation of lymphocyte migration to splenic white pulp does not involve common homing receptors. *Immunology*, p. 9, 2002.
- NORMANTON, M.; MARTI, L. C. Current data on IL-17 and Th17 cells and implications for graft versus host disease. *Einstein (São Paulo)*, v. 11, n. 2, p. 237–246, jun. 2013.
- OLIVEIRA, C. M. B. DE et al. Citocinas e Dor. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, v. 61, n. 2, 2011.
- OLIVEIRA, S. A. et al. Decreased humoral and pathologic responses in undernourished mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Parasitology Research*, v. 93, n. 1, p. 30–35, 1 maio 2004.
- ORREGO, H. et al. Effect of chronic alcohol intake on hepatic fibrosis and granulomas in murine schistosomiasis mansoni. *Hepatology*, v. 1, n. 5, p. 416–418, 1 set. 1981.
- PARK, P. et al. Regulation of Kupffer cell activity during chronic ethanol exposure: Role of adiponectin. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, v. 21, n. s3, p. S30–S33, out. 2006.
- PASCUAL, M. et al. TLR4 response mediates ethanol-induced neurodevelopment alterations in a model of fetal alcohol spectrum disorders. *Journal of Neuroinflammation*, v. 14, n. 1, p. 145, 24 dez. 2017.
- PEARCE, E. J. et al. Th2 response polarization during infection with the helminth parasite *Schistosoma mansoni*. v. 201, p. 117–126, 2004.

PEARCE, E. J.; MACDONALD, A. S. The immunobiology of schistosomiasis. *Nature Reviews Immunology*, v. 2, n. 7, p. 499–511, 2002.

PETROIANU, A.; OLIVEIRA, A. E.; ALBERTI, L. R. Hiperesplenismo em hipertensão porta por esquistossomose mansônica. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 26, n. 3, p. 195–201, 2004.

PORTO, M. A. F. et al. Implicações clínicas e imunológicas da associação entre o HTLV-1 e a esquistosomose. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 35, n. 6, p. 641–649, dez. 2002.

PRUETT, S. B.; FAN, R. Ethanol inhibits LPS-induced signaling and modulates cytokine production in peritoneal macrophages in vivo in a model for binge drinking. *BMC immunology*, v. 10, p. 49, 18 set. 2009.

PRUETT, S. B.; HAN, Y. C.; WU, W. J. A brief review of immunomodulation caused by acute administration of ethanol: involvement of neuroendocrine pathways. *Alcohol and alcoholism (Oxford, Oxfordshire)*. Supplement, v. 2, p. 431–7, 1994.

RAMOS, T. M. DE B. et al. Alterações nos níveis de colesterol, triglicérido e fosfolípídeo total em plasma de *Callithrix jacchus* (sagüi) reinfestado por *Schistosoma mansoni*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 37, n. 1, p. 37–40, fev. 2004.

ROMEO, J. et al. Changes in the Immune System after Moderate Beer Consumption. *Annals of Nutrition and Metabolism*, v. 51, n. 4, p. 359–366, 2007.

RUTITZKY, L. I.; ROSA, J. R. L. DA; STADECKER, M. J. Severe CD4 T cell-mediated immunopathology in murine schistosomiasis is dependent on IL-12p40 and correlates with high levels of IL-17. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, v. 175, n. 6, p. 3920–6, 15 set. 2005.

RUTITZKY, L. I.; STADECKER, M. J. CD4 T cells producing pro-inflammatory interleukin-17 mediate high pathology in schistosomiasis. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 101 Suppl 1, p. 327–30, set. 2006.

RUTITZKY, L. I.; STADECKER, M. J. Exacerbated egg-induced immunopathology in murine *Schistosoma mansoni* infection is primarily mediated by IL-17 and restrained by IFN- γ . *European Journal of Immunology*, v. 41, n. 9, p. 2677–2687, set. 2011.

SAITO, H. et al. Reticular meshwork of the spleen in rats studied by electron microscopy. *American Journal of Anatomy*, v. 181, n. 3, p. 235–252, mar. 1988.

SANTOS, E. W. et al. Hematological and biochemical reference values for C57BL / 6 , Swiss Webster and BALB / c mice Swiss Webster e BALB / c. p. 138–145, 2016.

SANTOS, S. B. et al. Clinical and immunological consequences of human T cell leukemia virus type-I and *Schistosoma mansoni* co-infection. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 99, n. suppl 1, p. 121–126, ago. 2004.

SHUKLA, S. D.; LIM, R. W. Epigenetic Effects of Ethanol on the Liver and Gastrointestinal System 47 Epigenetic Effects of Ethanol on the Liver and Gastrointestinal System. *Alcohol*

Research: Current Reviews, p. 10, 2013.

SILVA, F. L. Resposta imune celular e patologia hepática de camundongos desnutridos , infectados com *Schistosoma mansoni*. Mestrado em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para, 2008.

SILVA, J. R. *Schistosoma* Infection and *Schistosoma* -Derived Products Modulate the Immune Responses Associated with Protection against Type 2 Diabetes. v. 8, n. January, p. 1–8, 2018.

SILVA, M. L. S. et al. Association between *Strongyloides stercoralis* infection and cortisol secretion in alcoholic patients. *Acta Tropica*, v. 154, p. 133–138, 1 fev. 2016.

SIMÕES, C. et al. Parasitological characteristics of *Schistosoma mansoni* infection in swiss mice with underlying malnutrition. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 97 Suppl 1, p. 143–7, 2002.

SIMÕES, L. . et al. Host-parasite relationship between *Biomphalaria amazonica* (Paraense, 1966) and *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907). *Revista de Biologia Tropical*, p. 1–7, 2017.

SKELLY, P. J. et al. Schistosome feeding and regurgitation. *PLoS pathogens*, v. 10, n. 8, p. e1004246, ago. 2014.

SOUZA, F. P. C. DE et al. Esquistossomose mansônica : aspectos gerais , imunologia , patogênese e história natural. v. 9, n. 4, p. 0–7, 2011.

STARKENBURG, S.; MUNROE, M. E.; WALTENBAUGH, C. Early alteration in leukocyte populations and Th1/Th2 function in ethanol-consuming mice. *Alcoholism, clinical and experimental research*, v. 25, n. 8, p. 1221–30, ago. 2001.

SUMIDA, K. D.; COGGER, A. A.; MATVEYENKO, A. V. Alcohol-induced suppression of gluconeogenesis is greater in ethanol fed female rat hepatocytes than males. *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)*, v. 41, n. 2, p. 67–75, mar. 2007.

SUTTIE, A. W. Histopathology of the Spleen. *Toxicologic Pathology*, v. 34, n. 5, p. 466–503, 25 ago. 2006.

TALLIMA, H.; HAMADA, M.; EL RIDI, R. Evaluation of cholesterol content and impact on antigen exposure in the outer lipid bilayer of adult schistosomes. *Parasitology*, v. 134, n. 12, p. 1775–83, 9 nov. 2007.

TANABE, M. Haemostatic abnormalities in hepatosplenic schistosomiasis mansoni. v. 52, p. 351–359, 2003.

TEIXEIRA, C. et al. Detection of *Schistosoma mansoni* eggs in feces through their interaction with paramagnetic beads in a magnetic field. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 1, n. 2, p. e73, 14 nov. 2007.

TEIXEIRA, M. C. A. et al. *Strongyloides stercoralis* Infection in Alcoholic Patients. *BioMed Research International*, v. 2016, n. January, 2016.

VAN DAM, G. J. et al. Diagnosis of Schistosomiasis by Reagent Strip Test for Detection of

Circulating Cathodic Antigen. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, v. 42, n. 12, p. 5458–5461, 2004.

VELLA, A. T.; HULSEBOSCH, M. D.; PEARCE, E. J. *Schistosoma mansoni* eggs induce antigen-responsive CD44-hi T helper 2 cells and IL-4-secreting CD44-lo cells. Potential for T helper 2 subset differentiation is evident at the precursor level. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), v. 149, n. 5, p. 1714–22, 1 set. 1992.

WALL, T. L.; LUCZAK, S. E.; HILLER-STURMHÖFEL, S. *Biology, Genetics, and Environment: Underlying Factors Influencing Alcohol Metabolism. Alcohol research : current reviews*, v. 38, n. 1, p. 59–68, 2016.

WEIBEL, E. R. *Stereological Methods. Practical Methods for Biological Morphometry. Journal of Microscopy*, v. 121, p. 131–132, 1981.

WILCOX, D. A. *Megakaryocyte- and megakaryocyte precursor-related gene therapies. Blood*, v. 127, n. 10, p. 1260–8, 10 mar. 2016.

WILSON, M. S. et al. *Immunopathology of schistosomiasis. Immunology and Cell Biology*, v. 85, n. 2, p. 148–154, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Global status report on alcohol and health. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/274603/9789241565639-eng.pdf?ua=1>>. Acesso em: 24 jan. 2019.*

ZAGO-GOMES, M. P. et al. *Prevalence of intestinal nematodes in alcoholic patients. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 35, n. 6, p. 571–574, dez. 2002.