

Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico Faculdade de Ciências Médicas

Juliana de Lima Ferreira

Caracterização das alterações renais em camundongos esquistossomóticos submetidos à ingestão de etanol

> Rio de Janeiro 2023

Juliana de Lima Ferreira

Caracterização das alterações renais em camundongos esquistossomóticos submetidos à ingestão de etanol

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana.

Orientadora: Prof^a. Dra. Renata Heisler Neves

Rio de Janeiro 2023

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

F383	Ferreira, Juliana de Lima. Caracterização das alterações renais em camundongos esquistossomóticos submetidos à ingestão de etanol / Juliana de Lima Ferreira – 2023. 49 f.
	Orientadora: Prof. ^a Dra. Renata Heisler Neves
	Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Microbiologia.
	1. Schistosoma mansoni - Teses. 2. Etanol - Teses. 3. Rim - Teses. I. Neves, Renata Heisler. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.
	CDU 595.122.22

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira CRB7/6382

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

Assinatura

Data

Juliana de Lima Ferreira

Caracterização das alterações renais em camundongos esquistossomóticos submetidos à ingestão de etanol

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana.

Aprovada em 25 de outubro de 2023.

Orientadora: Prof.^a Dra. Renata Heisler Neves

Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Banca Examinadora:

Prof. Dr. José Roberto Machado e Silva Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof.^a Dra. Alba Cristina Miranda de Barros Alencar Universidade Federal Fluminense

Prof.^a Dra. Claudia Maria Antunes Uchoa Souto Maior Universidade Federal Fluminense

> Rio de Janeiro 2023

AGRADECIMENTOS

À Universidade do Estado do Rio de Janeiro/UERJ e ao Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz por possibilitarem a elaboração deste trabalho.

À minha orientadora, Prof^a. Dra. Renata Heisler Neves, por ter dado a oportunidade de iniciar minha iniciação científica no departamento de Parasitologia dando a continuidade a minha dissertação de mestrado.

À minha co-orientadora, Luciana Bezerra Brandão, por toda sua dedicação e apoio para a realização e conclusão deste trabalho, por ter me moldado da iniciação científica até a conclusão do meu mestrado, com toda calma e paciência.

À Minha família e amigos por ter me dado apoio, nos momentos melhores momentos e também nos momentos difíceis.

À Tathiane de Oliveira Costa Alves por te caminhado comigo da faculdade até aqui, me apoiando sempre, me ajudando na realização do trabalho e nas demais tarefas, faltam-me palavras para agradecer a presença dessa amiga incrível na minha vida.

Ao Técnico Kaio que chegou no finalzinho, mas se mostrou um grande amigo, sempre me apoiando e me ajudando para que nada me abalasse.

Ao Técnico Luiz Roberto por ser um amigo incrível, compartilhando comigo dos melhores e piores momentos.

A todas as pessoas da Disciplina de Parasitologia Departamento de Imunologia, Microbiologia e Parasitologia, FCM/UERJ que contribuíram direta ou indiretamente para o desenvolvimento desse projeto e pelo bom convívio no ambiente de trabalho.

RESUMO

FERREIRA, Juliana de Lima. *Caracterização das alterações renais em camundongos esquistossomóticos submetidos à ingestão de etanol.* 2023. 49f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

O principal órgão acometido tanto pela ingestão de etanol como pela esquistossomose mansônica é o figado, no entanto, ambas as situações também podem acometer outros órgãos, como os rins. Com isso, esse trabalho teve como objetivo avaliar o rim de camundongos esquistossomóticos associado à ingestão de etanol. Camundongos machos Swiss Webster foram infectados com 80 cercarias (Schistosoma mansoni da cepa BH) e a ingestão de etanol à 18% foi realizada por via oral (gavagem), uma vez ao dia, com 200µ/dia, durante 28 dias consecutivos, sendo a administração iniciada na quinta semana após infecção. Os grupos ficaram divididos em: Grupo CNI (não infectado e sem etanol); Grupo AL (não infectado e com etanol); Grupo IN (infectado e sem etanol); Grupo INAL (infectado e com etanol). Após nove semanas de infecção, os animais foram eutanasiados e os rins foram removidos, fixados, submetidos ao processamento histológico de rotina e corados em hematoxilina e eosina (HE) para avaliar alterações histopatológicas qualitativa, morfométricas e estereológicas, e Picrosirius red (polarização) para quantificação de colágeno no parênquima. Foram avaliados os seguintes parâmetros: área do glomérulo; área do tufo glomerular; área do espaço de Bowman; diâmetro do tufo glomerular; percentual da densidade de volume do córtex; da medula; dos glomérulos; dos túbulos proximais e distais; dos vasos; e de possíveis infiltrados leucocitários. A estatística foi realizada pelo teste One-Way ANOVA, com pós teste Student-Newman-Keuls, considerando os valores de p≤0,05. Foi observado na histopatologia do grupo AL, infiltrado leucocitário, desnaturação de proteínas, edema medular e vacuolização dos túbulos contorcidos proximais. O grupo IN também apresentou infiltrado leucocitário, presença de necrose dos túbulos proximais, edema medular e destruição da cápsula de Bowman. O grupo INAL, além das alterações anteriormente descritas, apresentou proliferação de células mesangiais e glomérulo com tamanho menor em relação aos demais grupos estudados. Os animais do grupo AL (+342%) e INAL (+349%) apresentaram aumento na deposição de colágeno comparados com o grupo CNI. A morfometria mostrou aumento nos parâmetros analisados: área total do glomérulo no grupo AL (+47%), grupo IN (+71%) e grupo INAL (+54%) comparados com o grupo CNI; área do tufo glomerular no grupo AL (+42%), grupo IN (+82%) e grupo INAL (+72%) em relação ao grupo CNI; área do espaço Bowman no grupo AL (+58%), grupo IN (+51%) e o grupo INAL (+68%) em comparação ao grupo CNI; diâmetro do tufo glomerular grupo AL (+21%), grupo C (+39%) e grupo INAL (+42%) ao serem comparados com o grupo CNI e houve aumento no grupo INAL quando comparado ao grupo AL (+17%). Em relação ao percentual da densidade de volume, os túbulos contorcidos proximais apresentaram diminuição no grupo IN (-22%) e INAL (-22%) em relação ao grupo CNI, os túbulos contorcidos distais mostraram menor percentual nos grupos AL (-62%), grupo IN (-58) e grupo INAL (-79%) comparados ao grupo CNI, e houve aumento de infiltrado leucocitário no grupo AL (+14%), grupo C (+13%) e grupo INAL (+16%) comparado ao grupo CNI. Concluiu-se que a associação alterou a integridade do parênquima renal, aumentando o processo inflamatório, gerando sérios danos morfofuncionais ao órgão, o que causou injúria renal exacerbada.

Palavras-chave: esquistossomose mansônica; etanol; rim; histopatologia.

ABSTRACT

FERREIRA, Juliana de Lima. *Characterization of renal alterations in schistosomotic mice subjected to ethanol ingestion.* 2023. 49f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

The main organ affected by both ethanol ingestion and schistosomiasis mansoni is the liver. However, both situations can also affect other organs, such as the kidneys. The aim of this study was to evaluate the kidneys of schistosomal mice associated with ethanol ingestion. Male Swiss Webster mice were infected with 80 cercariae (Schistosoma mansoni strain BH) and ingested 18% ethanol orally (by gavage), once a day, at $200\mu/day$, for 28 consecutive days, with administration starting on the fifth week after infection. The groups were divided into: CNI Group (uninfected and without ethanol); AL Group (uninfected and with ethanol); IN Group (infected and without ethanol); INAL Group (infected and with ethanol). After nine weeks of infection, the animals were euthanized and the kidneys were removed, fixed, subjected to routine histological processing and stained in hematoxylin and eosin (HE) to assess qualitative, morphometric and stereological histopathological changes, and Picrosirius red (polarization) to quantify collagen in the parenchyma. The following parameters were assessed: area of the glomerulus; area of the glomerular tuft; area of Bowman's space; diameter of the glomerular tuft; percentage volume density of the cortex; medulla; glomeruli; proximal and distal tubules; vessels; and possible leukocyte infiltrates. Statistics were performed using the One-Way ANOVA test, with the Student-Newman-Keuls post-test, considering p-values≤0.05. The histopathology of the AL group showed leukocyte infiltration, protein denaturation, medullary edema and vacuolization of the proximal convoluted tubules. The IN group also showed a leukocyte infiltrate, necrosis of the proximal tubules, medullary edema and destruction of Bowman's capsule. In addition to the alterations described above, the INAL group showed proliferation of mesangial cells and smaller glomeruli compared to the other groups studied. The animals in the AL (+342%) and INAL (+349%) groups showed an increase in collagen deposition compared to the CNI group. Morphometry showed an increase in the parameters analyzed: total glomerulus area in the AL group (+47%), IN group (+71%) and INAL group (+54%) compared to the CNI group; glomerular tuft area in the AL group (+42%), IN group (+82%) and INAL group (+72%) compared to the CNI group; Bowman's space area in the AL group (+58%), IN group (+51%) and INAL group (+68%) compared to the CNI group; glomerular tuft diameter in the AL group (+21%), C group (+39%) and INAL group (+42%) compared to the CNI group and there was an increase in the INAL group compared to the AL group (+17%). With regard to the percentage of volume density, the proximal convoluted tubules showed a decrease in the IN group (-22%) and INAL group (-22%) compared to the CNI group, the distal convoluted tubules showed a lower percentage in the AL group (-62%), IN group (-58%) and INAL group (-79%) compared to the CNI group, and there was an increase in leukocyte infiltrate in the AL group (+14%), C group (+13%) and INAL group (+16%) compared to the CNI group. It was concluded that the association altered the integrity of the renal parenchyma, increasing the inflammatory process, generating serious morphofunctional damage to the organ, which caused exacerbated renal injury.

Keywords: Schistosomiasis mansoni; ethanol; kidney; histopathology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Distribuição da esquistossomose segundo a média do percentual de positiva	idade
por município. Brasil, 2009-2020	11
Figura 2 - Ciclo de vida do Schistosoma mansoni	12
Figura 3 - Granuloma esquistossomótico	13
Figura 4 - Esquema do Rim de camundongo adulto.	15
Figura 5 - Histologia renal	16
Figura 6 - Desenho experimental	25
Quadro 1 - Etapas para obtenção de um preparado histológico permanente	34
Quadro 2 - Finalidade da técnica de coloração empregada	35
Figura 7 - Parênquima renal de camundongos não infectados e não submetidos a inge	stão de
etanol (Grupo CNI).	
Figura 8 - Parênquima renal de camundongos submetidos à ingestão de etanol à 18%,	durante
28 dias consecutivos (Grupo AL).	32
Figura 9 - Parênquima renal de camundongos infectados e não submetidos à ingestão	de
etanol (Grupo IN)	
Figura 10 - Parênquima renal de camundongos infectados e submetidos à ingestão de	etanol à
18%, durante 28 dias consecutivos (Grupo INAL).	34
Tabela 1 - Dados morfométricos e quantificação de colágeno dos rins de camundongo	DS
submetidos à ingestão de etanol à 18% ou não (média ±desvio padrão)	
Tabela 2 - Densidade do volume determinada por estereologia D36 (%) das estruturas	s do rim
de camundongos infectados ou não e submetidos à ingestão de etanol à 18%	% (média
± desvio-padrão).	

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AL	Ingestão de etanol
Clq	Proteína de ativação do Sistema complemento
C3	Proteína de ativação do Sistema complemento
CNI	Controle não infectado
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DMIP	Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia
DAMPS	Damage-associated molecular patterns
DRC	Doença renal crônica
FCM	Faculdade de Ciências Médicas
GN	Glomerulonefrite viral
HClO	Ácido hipocloroso
IBRAG	Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IN	Infectado
INAL	Infectado com ingestão de etanol
IRGN	Glomerulonefrite relacionada à infecção
H&E	Hematoxilina e Eosina
LRA	Lesão renal aguda
MBG	Glomerulonefrite membranoproliferativa
MPGN	Glomerulonefrite membranoproliferativas primária
N.O.	Não observado
PAF	Platelet-activating factor
TCD	Túbulo contorcido distal
ТСР	Túbulo contorcido proximal
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro

LISTA DE SÍMBOLOS

% Porcentagem Mais ou menos ± Multiplicação × Alfa α β Beta cm Centímetro μm^2 Micrômetro μl Microlitros Ø Diâmetro Vi Velocidade inicial Velocidade final Vf Ci Concentração inicial Cf Concentração final

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	10
OBJETIVOS	23
Geral	23
Específicos	24
MATERIAL E MÉTODOS	24
Comitê de ética	24
Desenho experimental	24
Animais	25
Infecção experimental	26
Ingestão de etanol	26
Processamento do tecido e análise histopatológica	27
Morfometria dos Glomérulos	28
Estereologia	29
Análises estatísticas dos dados	29
RESULTADOS	30
Análise histopatológica do rim	30
Análise histopatológica renal de camundongos não infectado	30
Análise histopatológica renal não infectados e com ingestão de etanol	31
Análise histopatológica renal de camundongos infectados e sem ingestão de etanol	32
Análise histopatológica renal de camundongos infectados e submetidos à	52
ingestão de etanol à 18%	33
Morfometria glomérulo e quantificação colágeno	35
Estereologia D36	38
DISCUSSÃO	39
CONCLUSÕES	44
REFERÊNCIAS	45
	INTRODUÇÃO OBJETIVOS Geral Específicos MATERIAL E MÉTODOS. Comitê de ética Desenho experimental Animais Infecção experimental. Ingestão de etanol Processamento do tecido e análise histopatológica Morfometria dos Glomérulos. Estereologia Análises estatísticas dos dados. RESULTADOS Análise histopatológica do rim Análise histopatológica renal de camundongos não infectado. Análise histopatológica renal de camundongos não infectado. Análise histopatológica renal de camundongos não infectado. Análise histopatológica renal de camundongos infectados e sem ingestão de etanol Análise histopatológica renal de camundongos infectados e sem ingestão de etanol Análise histopatológica renal de camundongos infectados e sem ingestão de etanol Análise histopatológica renal de camundongos infectados e sem ingestão de etanol Análise histopatológica renal de camundongos infectados e submetidos à ingestão de etanol à 18%. Morfometria glomérulo e quantificação colágeno Estereologia D36 DISCUSSÃO CONCLUSÕES REFERÊNCIAS

INTRODUÇÃO

A esquistossomose é considerada uma doença tropical negligenciada, sendo endêmica apontada como a segunda parasitose de importância epidemiológica e com repercussão socioeconômica, constituindo assim um grande problema de saúde pública, somente perdendo para a malária (BRASIL, 2014).Está associada à pobreza e ao baixo poder econômico, o que leva a população a necessidade de utilizar águas contaminadas para atividades, como agricultura, lazer e serviços domésticos. Estima-se que cerca de 90 % das pessoas que necessitam de tratamento para esquistossomose vivem na África (WHO, 2023). Essa doença é causada por trematódeos que pertencem ao gênero *Schistosoma* Weinland, 1858. As espécies principais que infectam o homem, de forma hepatointestinal e hepatoesplênica são *Schistosoma mansoni* Sambon 1907, transmitido pelo molusco do gênero *Biomphalaria* Preston, 1910 (África, Oriente médio, Caribe, Brasil, Venezuela e Suriname), e *Schistosoma japonicum* Katsurada, 1904, transmitido pelo molusco do gênero *Oncomelania* Gredlr,1881 (China, Filipinas e Indonésia). A forma urogenital é causada pelo *Schistosoma haematobium* Bilharz, 1852, transmitida pelo molusco do gênero *Bulinus* O. F. Muller (África, Oriente médio e França) (WHO, 2023).

No Brasil, a esquistossomose é causada pelo *S. mansoni*, que depende tanto da presença de hospedeiros definitivos (homem e pequenos roedores), quanto dos hospedeiros intermediários (caramujo) e condições ideais ambientais para manutenção do seu ciclo biológico (SOUZA et al., 2011). Estima-se que cerca de 1,5 milhões de pessoas vivem em áreas sob risco de contrair a doença. As regiões com os estados mais afetados são Nordeste e Sudeste, com a ocorrência diretamente ligada à presença dos moluscos transmissores (hospedeiros intermediários). Atualmente, está presente de forma intensificada em 19 Unidades Federadas. As áreas endêmicas (Figura 1) de transmissão consistem nos estados de Alagoas, Bahia, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Paraíba, Sergipe e Minas Gerais. Já no Pará, Maranhão, Piauí, Espírito Santo, Ceará, Rio de Janeiro, São Paulo, Santa Catarina, Paraná, Rio Grande do Sul, Goiás e no Distrito Federal a transmissão é focal, ou seja, não atingindo assim grandes áreas (BRASIL, 2014).



Figura 1 - Distribuição da esquistossomose segundo a média do percentual de positividade por município. Brasil, 2009-2020.

Fonte: (BRASIL, 2021)

Ciclo biológico

O ciclo se inicia (Figura 2), quando um indivíduo (hospedeiro definitivo) elimina fezes, onde há a presença de ovos maduros, contendo miracídio em seu interior. Ao entrar em contato com a água doce, ocorre a eclosão do miracídio e, devido a estímulos quimiotáticos e por fototaxia, nadam através de movimentos ciliares até que encontre o molusco do gênero *Biomphalaria* (hospedeiro intermediário) (MCMANUS et al., 2018). O miracídio ao penetrar no molusco, transforma-se em esporocisto primário, que se reproduz gerando esporocistos secundários filhos, que irão dar origem às cercárias. As cercárias deixam o molusco e ficam em meio aquático até encontrar o hospedeiro definitivo, iniciando assim a segunda fase parasitária. As cercarias irão penetrar ativamente no hospedeiro, utilizando a enzima proteolítica elastase secretada pelas glândulas de penetração, onde elas vencem as barreiras dérmicas. Ao penetrarem ativamente na pele do homem, perdem a cauda e transforma-se em esquistossômulos, onde irão cair na corrente sanguínea, passando pelo coração, pulmão até chegar ao figado. Os esquistossômulos por sua vez, alimentam-se de sangue, amadurecem e se tornam vermes adultos macho e fêmea, que acasalam e migram para veia mesentérica inferior,

onde ocorre a postura de ovos pela fêmea. Os ovos precisam alcançar a luz intestinal, com isso atravessam a parede do intestino e são eliminados pelas fezes, iniciando assim um novo ciclo (MCMANUS et al., 2018).



Figura 2 - Ciclo de vida do Schistosoma mansoni

Legenda: 1 - ovo do *Schistosoma mansoni* sendo liberado junto com fezes em água doce; 2 – ovo, em contato com a água, libera o miracídio; 3 - miracídio penetra no tecido do molusco; 4 - miracídio gera esporocistos com sucessivas gerações; 5 - esporocistos de segunda geração geram cercarias e estas saem do caramujo em busca do hospedeiro vertebrado; 6 - cercaria penetra na pele do hospedeiro vertebrado; 7 - cercaria perde a cauda e se transforma em esquistossômulos; 8 – esquistossômulos caem na corrente sanguínea e ganham a circulação; 9 - parasitos migram para o sistema hepático e se transformam em helmintos adultos; 10 - casal de adultos migra para veias mesentéricas, a fêmea inicia postura de ovos que chegam ao figado pela circulação ou atravessam a parede intestinal e são liberados com as fezes. i: Estágio infectante; d: Estágio diagnóstico.

Fonte: Modificado de CDC, 2019.

Importância do parasito nas manifestações clínicas da esquistossomose mansônica

As manifestações esquistossomóticas são divididas pela fase inicial e fase tardia. A fase inicial ocorre a partir da penetração da cercária, onde as respostas imunes causadas por elas dão origem a reações de hipersensibilidade e causam uma reação pruriginosa maculopapular, denominada dermatite cercariana no local da penetração da cercaria. Com uma penetração bem

sucedida da cercária, ocorre a transformação em esquistossômulos, a infecção avança para um estágio sintomático agudo. Já a fase tardia se dá pela presença dos ovos dos parasitos no figado, baço e intestino. Portanto, esses acontecimentos indicam a forma avançada da doença e/ou hepatoesplenomegalia na maioria dos casos. A hepatoesplenomegalia é mais frequente, onde a incidência de ovos encontrados nas fezes da população é muito elevada, demonstrando alta carga parasitária, relacionada com a gravidade da doença (ANDRADE, 2008; NEVES, 2016).

Ovos podem ser eliminados nas fezes, ficar retidos no intestino, causando a formação de pequenos granulomas ou serem carreados pela corrente sanguínea até o figado. A presença desses ovos no figado induz a principal patogênese da esquistossomose, onde provocam uma reação inflamatória em seu entorno. Os antígenos solúveis do ovo irão levar a uma resposta inflamatória e a consequente formação dos granulomas (Figura 3).

Figura 3 - Granuloma esquistossomótico



Legenda: Tecido Hepático de camundongos infectados com esquistossomose mansoni, corado em hematoxilina e eosina. A, B, C - Fígados infectado mostrando infiltrado leucocitário. Barra: 50μm (B e C) 100 μm (A). Fonte: BRANDÃO-BEZERRA et al., 2022.

A formação do granuloma é estimulada por antígenos solúveis do ovo que atraem células inflamatórias como neutrófilos, macrófagos, eosinófilos e linfócitos, além de serem circundados por fibras de colágeno. Com a constante chegada dos ovos ao figado, esses processos se acumulam, dificultando a passagem do sangue proveniente da veia porta e culminando com a hipertensão portal. O agravamento da hipertensão portal induz a formação da circulação colateral que acontece entre o sistema porta e a circulação sistêmica (ANDRADE, 2008).

A patogênese da esquistossomose mansônica depende da interação parasitohospedeiro, estando associada a diversos fatores importantes como a cepa, a fase evolutiva, intensidade e o número de infecções e associações com outras morbidades (MCMANUS et al., 2018).

Os rins

Os rins (Figura 4a) possuem uma forma que se assemelha a um grão de feijão, com uma borda convexa (lateral) e outra côncava (medial), onde se encontra o hilo renal e saem os ureteres, que irão se reunir para formar a pelve renal (parte superior e dilatada do ureter). Possui duas regiões distintas: zona cortical, que se localiza na margem do rim; e medular que se encontra na parte interna do órgão (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

O volume de plasma total de um indivíduo saudável circula pelos rins diversas vezes por dia. Devido a isso, uma grande circulação sanguínea, permite a filtração, reabsorção de substâncias importantes para o organismo e a excreção de produtos irrelevantes para o metabolismo celular. O sangue a ser filtrado chega pela arteríola aferente, desembocando em um polo vascular que origina os capilares do glomérulo que irão filtrar as substâncias presentes no sangue como: água; glicose, ureia, aminoácidos, íons bicarbonato, íons Na⁺ e Cl⁻, que são moléculas menores. Depois da passagem por essa barreira gera o filtrado de composição semelhante à do plasma, mas quase sem proteínas, que por serem moléculas grandes, não conseguem atravessar a parede dos capilares glomerulares. O filtrado passa do espaço capsular para o polo urinário, em seguida passam para o túbulo contorcido proximal, onde as células do túbulo reabsorvem glicose, aminoácidos, vitaminas, hormônios, parte dos sais e a maior parte da água. A parte delgada descendente é permeável à água, creatinina e ureia, onde o filtrado se torna hipertônico. Já na parte ascendente é impermeável à água, creatinina e ureia, porém muito permeável aos íons Cl⁻ e Na⁺, onde o filtrado irá se tornar hipotônico. No túbulo distal, o filtrado chega hipotônico com alta concentração de água, creatinina e ureia, e é capaz de realizar o transporte de íons. Essa urina hipotônica passa dos túbulos contorcidos distais para o túbulo coletor, o cílio primário se curva pelo fluxo do líquido, onde promove a entrada do íon na célula (RADI, 2019).

A alça de Henle, forma um novo segmento do néfron, possuindo um formato de "U". Ao entrar no córtex renal, a alça de Henle é denominada de tubo contorcido distal, mesmo que possua a mesma estrutura histológica. Seguido ao túbulo contorcido distal, situam-se os túbulos coletores que, contendo células claras, mais abundante ou intercalando com células escuras. Estes se unem tornando-se mais espessos até ao encontro da papila renal. Na medula, os túbulos coletores são cúbicos ou colunar, denominada pirâmides medulares, que possuem somente células claras. A base da pirâmide medular situa-se no limite corticomedular, e a papila é voltada para o hilo. Os túbulos coletores não são mais formados por epitélio cúbico, à medida que se unem. Estes túbulos abrem-se na extremidade da papila, formando uma área crivosa, onde cada papila projeta-se em um cálice menor, que vão se unir em dois a quatro cálices maiores desembocando na pelve (BULGER, 1981b; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

O néfron (Figura 4c) é constituído por glomérulos e túbulos renais (túbulo contorcido proximal formado, por um epitélio simples cúbico contendo microvilos (borda em escova), alça de Henle e túbulo contorcido distal e túbulo coletor. Os glomérulos (Figura 5) são formados por cápsula glomerular (cápsula de Bowman), tufo glomerular e espaço urinário. A cápsula de Bowman, é formada por dois folhetos, um visceral (interno), revestida por células especializadas chamadas de podócitos, localizadas junto aos capilares glomerulares envolvido por vasos sanguíneos, e um parietal (folheto externo) de epitélio simples pavimentoso, limitando o glomérulo renal. Entre esses folhetos, encontra-se uma região chamada de espaço glomerular. Há uma região no glomérulo renal chamada de polo vascular, onde se encontra a arteríola aferente que se insere e se ramifica para formar os capilares glomerulares e depois formar a arteríola eferente (POLLAK et al., 2014).



Figura 4 - Esquema do Rim de camundongo adulto

Fonte: VEIRA, 2023.





Legenda: A – Esquema macroscópico sobre o rim; B – Anatomia do néfron; C – Visualização do glomérulo renal e suas estruturas.

Fonte: Adaptado de POLLAK et al., 2014.

Os rins possuem cerca de um milhão de unidades funcionais denominadas néfrons. Os néfrons tem como função controlar a quantidade de líquidos do organismo, a eliminação de resíduos do sangue e retorno de substâncias úteis, regulação do pH sanguíneo e hidroeletrolítico, controla a pressão arterial, produção de urina e a resíduos tóxicos, ureia, creatinina e ácido úrico (WANG; GARRETT, 2017).

Os capilares do glomérulo são revestidos por células especializadas, denominadas podócitos (figura 5), que apresentam corpo celular arredondado e grande, de onde partem as ramificações, chamadas de prolongamento primários e secundários, também nomeados de pedicelos. Estes se intercalam, formando interdigitações, e se ancoram externamente na

membrana basal dos capilares pela integrina $\alpha 3\beta 1$, sendo o principal heterodímero na superfície de podócitos. A membrana basal glomerular (MBG) é revestida por endotélio capilar do tipo fenestrado, permitindo assim que o fluido passe pelas fenestras e, em seguida, pela MGB, impedindo a passagem de solutos de grande peso molecular. Após a MBG, o fluido passa pelas fendas de filtração. Esta região possui o diagrama da fenda, uma membrana fina que tem a função de impedir a passagem de moléculas menores do ultrafiltrado plasmático. Com isso, a barreira de filtração glomerular possui três estruturas, endotélio fenestrado MBG e podócitos (NDISANG, 2018). A MBG também é composta por uma camada de colágeno tipo IV, laminina e fibronectina, que atuam na associação das células endoteliais da MBG com os podócitos, mantendo a integridade da membrana e atua como barreira física (GRAHAMMER, 2017).

As células mesangiais encontradas no corpúsculo renal são células associadas à MGB dos capilares glomerulares. Estas produzem matriz mesangial extracelular, fornecendo sustentação estrutural aos podócitos, mantendo a integridade do glomérulo. Essas secretam e sintetizam diferentes moléculas como prostaglandina, endotelina e agentes vasoativos e, por endocitose, processam proteínas plasmáticas e removem macromoléculas que ficam retidas na membrana basal dos capilares (MBG) e nas fendas de filtração dos podócitos. Possuem propriedades que contribuem para controlar a taxa de filtração glomerular, através da ativação de receptores para angiotensina II e aldosterona. Com isso, as células mesangiais atuam na regulação funcional e no remodelamento do tecido renal, e suponha-se que a lesão podocitária provoque alterações nas células mesangiais, levando à perda da matriz mesangial, proliferação dessas células, seguida da deposição excessiva de matriz extracelular, produção de citocinas inflamatórias, quimiocinas, enzimas e moléculas de adesão que participam do processo de fibrose glomerular renal (KURIHARA; SAKAI, 2017; ZHAO, 2019).

Manifestação da esquistossomose mansoni no rim

Além do figado, intestino e baço, outro órgão acometido pela doença é o rim. O comprometimento renal é ocasionado pela deposição dos imunocomplexos formados pelos antígenos solúveis dos ovos que se depositam na região glomerular levando a formação da glomerulopatia esquistossomótica (ANDRADE, 2004; ANDRADE E ROCHA, 1979). A resposta imunogênica e patogênica do hospedeiro relacionada a infecções parasitárias se

estende de lesão renal aguda a glomerulonefrite, amiloidose, distúrbios urológicos (esquistossomose urinária) e malignidade. Na esquistossomose causada por *S. haematobium* ocorre uma resposta granulomatosa ao redor de seus ovos na mucosa da bexiga que consolidam as massas sésseis formais e ulceradas. Apresenta-se geralmente com hematúria microscópica e macroscópica, e com a progressão da doença leva a fibrose e calcificação da bexiga, resultando em obstrução da saída ou refluxo vesico ureteral, finalmente pielonefrite crônica. A doença renal mediada por imunocomplexos ocorre na infecção por *S. japonicum* e *S. mansoni,* onde apresentam danos glomerulares, ou seja, lesões proliferativas mesangiais, proliferativas difusas, membranoproliferativas, segmentares focais e esclerosantes, que são definidas pela deposição de imunocomplexos sobre os glomérulos (PRASAD; PATEL, 2018b).

A manifestação da esquistossomose mansoni renal é mediada por imunocomplexos préformados na circulação por antígenos e anticorpos e, em seguida, depositados nos glomérulos, sendo mais frequente na forma hepatoesplênica da doença. No entanto, estudos têm demonstrado lesões glomerulares em indivíduos com esquistossomose hepatointestinal, onde as pessoas infectadas pelo *S. mansoni*, desenvolvem a nefropatia esquistossomótica, com maior prevalência, em adultos jovens, na terceira década de vida, sendo a expressão clínica mais importante da doença, a síndrome nefrótica (SOUZA *et al.*, 2011).

Estudos anteriores mostraram que na patogênese, os depósitos glomerulares predominantes em camundongos infectados por *S. mansoni* são compostos por IgA, sendo uma característica da nefropatia (perda na capacidade de filtragem), a glomerulonefrite primária mais comum, dificuldade na filtração (distúrbios no glomérulo). Considerara-se que os depósitos glomerulares de IgA sejam uma progressão da doença renal, pois foram observados em pacientes com hipertensão portal na forma hepatoesplênica da esquistossomose (ALAMARTINE et al., 2011).

Uma pesquisa mostrou que paciente com esquistossomose hepatoesplênica apresentou presença de depósitos de IgA, sendo mais intenso que a imunoglobulina IgG, acompanhadas de C1q e C3, podendo corresponder à nefropatia por IgA, que se trata de uma glomerulopatia esquistossomótica com depósitos mesangiais de IgA (GONÇALVES; FONTES; CANUTO, 2017

Já foi visto alterações tanto no túbulo quanto no glomérulo. No glomérulo, observa-se proliferação de células mesangiais, espessamento ou obliteração da membrana basal glomerular, aparecimento de glomérulo encolhido, achatamento ou apagamento dos processos do pé dos podócitos. Nos túbulos ocorre atrofia, vacuolização de células epiteliais tubulares e presença de vacúolos autofágicos (Eid *et al.*, 2017).

Doenças renais não infecciosas

Um dos desafios da saúde pública, também envolve as doenças não infecciosas como a obesidade, síndrome metabólica, doença renal crônica (DRC), doenças cardiovasculares, câncer doenças respiratórias crônicas e alcoolismo (WANG; WANG, 2020).

O consumo de bebidas alcoólicas faz parte da história da humanidade por diferentes décadas, há milhares de anos, sendo atualmente considerado um grande problema de saúde pública (OLIVEIRA et al., 2011). Estima-se que cerca de 5,1 % das doenças mundiais e lesões são devido ao consumo de bebidas alcoólicas e, de acordo com a Organização Mundial de Saúde, 3 milhões de pessoas morreram, devido ao uso nocivo de álcool. Este consumo leva a morte e a incapacidade relativamente cedo na vida. Aproximadamente 13,5% do total de mortes atribuíveis ao álcool está entre a faixa etária de 20 a 39 anos (WHO, 2022).

O etanol é o principal componente das bebidas alcoólicas, agindo como elemento tóxico a órgãos vitais como coração, cérebro, fígado e rins. Esta substância refere-se a uma molécula que se move com facilidade por meio de membranas celulares, atingindo rapidamente os tecidos. São considerados quatro aspectos no estudo da toxicocinética do etanol - absorção, distribuição, metabolismo e eliminação. Absorvido no estômago e intestino delgado, 90% é metabolizado no fígado e distribuído pelo organismo, caindo na circulação e sofrendo um processo químico chamada oxidação. Ao ser quimicamente modificado, libera energia e transforma-se numa substância tóxica, o acetaldeído, que se converte em acetato. A maior parte do acetato atinge outras partes do organismo, pela corrente sanguínea, para ser filtrado nos rins e expelido na urina (LE DARÉ; LAGENTE; GICQUEL, 2019).

O etanol é metabolizado no figado, onde pode desencadear a doença hepática alcoólica que é dívida em três fases: esteatose, hepatite alcoólica e cirrose (KOURKOUMPETIS E SOOD, 2019). A ingestão de álcool etílico abusiva, além de causar injúria hepática, pode desencadear, nos rins, modificações fisiológicas, morfológicas e transtornos hidroeletrolíticos, ou seja, diminuição da capacidade de filtragem (HARRIS et al., 2015). Já foi demonstrado, em estudos anteriores, que uso crônico de etanol induz estresse oxidativo no rim, infiltração de leucócitos, apoptose, diminuição da função renal, onde os túbulos apresentam vacuolização, ou seja, perda dos microvilos, induzindo a insuficiência renal aguda, que é caracterizada pela perda da filtração, fazendo com que resíduos nitrogenados fiquem retidos no sangue (LATCHOUMYCANDANE, NAGY E MCINTYRE, 2014).

Doenças renais infecciosas

As doenças renais induzidas por infecção podem causar lesão renal por invasão direta ou indiretamente por mecanismos imunomediados, que se manifestam como glomerulonefrite pós-infecciosa ou glomerulonefrite relacionada à infecção. Como exemplo de agentes infecciosos que causam lesões renais direta ou mediadas por imunidade estão os vírus bactérias, micobactérias, fungos, protozoários e helmintos(PRASAD E PATEL, 2018a). Essas doenças renais podem se manifestar de forma aguda ou crônica, dependendo dos patógenos, natureza endêmica/epidêmica e fonte de infecção. As lesões apresentam-se de várias formas: lesão renal aguda (LRA); síndrome de glomerulonefrite aguda e crônica; síndrome nefrótica; síndrome nefrótico-nefrótica aguda; nefrites tubulointersticial aguda ou crônica; e glomerulonefrite rapidamente progressiva. As infecções podem afetar o rim através de mecanismos imunológicos que envolvem antígenos que podem levar à geração de imunocomplexos circulantes ou *in situ*, como glomerulonefrite relacionada à infecção (IRGN) (PRASAD; PATEL, 2018).

As nefropatias infecciosas ocorrem em uma grande variedade de doenças virais, bacterianas e parasitárias, como malária, sífilis secundária, derivações arteriovenosas infectadas e endocardite bacteriana que são doenças, que podem levar à deposição de imunocomplexos nos glomérulos(FALCÃO; GOULD, 1975). O depósito de IgA na nefropatia é a marca registrada da doença, visto nas paredes capilares glomerulares, determinada geneticamente pelo aumento dos níveis de IgA1 circulante com galactose deficiente ó-glicanos na região da dobradiça do anticorpo. A síntese e ligação de anticorpos direcionados contra IgA1 com deficiência em galactose irão formar os imunocomplexos que se acumulam no mesângio glomerular. Esses imunocomplexos ativam células mesangiais, induzindo proliferação e secreção de matriz extracelular, citocinas e quimiocinas, resultando em lesão renal (SUZUKI et al., 2011).

Sabe-se que tanto o alcoolismo como a existência de parasitoses é frequente no Brasil e geram um grande problema de saúde pública. Levando-se em conta a prevalência e a distribuição geográfica de ambos, não se pode excluir a possibilidade de que os indivíduos apresentem essas comorbidades. Uma pesquisa antecedente mostrou que o alcoolismo favorece a infecção causada pelo nematódeo *Strongyloides stercoralis* Bavay, 1876, aumentando a sobrevivência deste parasito no duodeno e a liberação de suas larvas (MARQUES et al., 2010).

Esses acontecimentos ocorrem devido a ingestão de etanol induzir uma imunomodulação e/ou aumento do nível de corticoides ou de seus metabólitos, aumentando assim a fecundidade das fêmeas no duodeno e a maturação das larvas no intestino (MARQUES et al., 2010; ZAGO-GOMES et al., 2002). Além de estudos com nematoides envolvendo a associação de ingestão de álcool etílico, outros trabalhos também demonstraram essa associação com outras parasitoses, como a esquistossomose. Em trabalho anterior foi demonstrado a redução do diâmetro dos granulomas hepáticos em camundongos esquistossomóticos, com 120 dias de infecção e submetidos à ingestão de etanol à 7% em água, antes ou após a infecção (CASTRO et al., 1993). Em outro estudo foi observado uma redução no tamanho de granulomas hepáticos em camundongos submetidos a uma dieta líquida, contendo 35% de etanol em sua composição (ORREGO et al., 1981).

Em um estudo realizado recentemente, onde camundongos esquistossomóticos foram submetidos à ingestão de etanol à 18%, durante 28 dias consecutivos, foram observadas alterações tanto nos parâmetros relacionados ao parasito quanto ao hospedeiro. Brandão-Bezerra e colaboradores (2019) mostraram que helmintos recuperados de camundongos que fizeram a ingestão de etanol apresentaram danos no tegumento dos espécimes machos, onde observou-se perda de espinhos e tubérculos, achatamento dos tubérculos, descamação tegumentar e lesões erosivas. Também, observaram alterações morfológicas no sistema reprodutor dos parasitos, onde nos machos houve redução na densidade de células germinativas, e nas fêmeas houve alteração tanto na maturação dos oócitos quanto nas células das glândulas vitelínicas.

Na ingestão de etanol associada à esquistossomose experimental, quando o estudo focou no hospedeiro, a histopatologia do figado dos animais mostrou, além da presença de lesões periovulares (granulomas na fase exsudativa e fase exsudativo-produtivo), destruição panlobular do parênquima hepático, presença de necrose liquefativa em área de abscesso hepático, redução de microesteatose (esta causada pela ingestão de etanol), bem como redução da deposição de colágeno no granuloma (BRANDÃO-BEZERRA et al., 2022). Seguindo o mesmo desenho experimental do trabalho anterior, também foram observadas alterações histopatológicas no baço, como: desorganização estrutural da polpa branca e vermelha; aumento da quantidade de trabéculas e de megacariócitos; diminuição das fibras reticulares; aumento na área e perímetro da polpa branca (ROSA, 2019).

A esquistossomose acomete principalmente o fígado, devido aos ovos produzidos pelo *S. mansoni* desencadearem uma resposta inflamatória granulomatosa. Já no rim ocorre um processo inflamatório, consequente da formação de imunocomplexos, que são carreados pela circulação e depositados no glomérulo. O uso abusivo de etanol, ingerido através de bebidas alcoólicas, torna-se maléfico ao indivíduo devido ao seu consumo crônico. No rim, esse consumo de bebidas alcoólica leva a um estresse oxidativo, infiltração de leucócitos, apoptose, diminuição da função renal, onde os túbulos apresentam vacuolização, ou seja, perda dos microvilos, induzindo a insuficiência renal aguda (MINCIS; MINCIS, 2006).

Como a sobreposição de áreas endêmicas de esquistossomose com regiões, onde também se faz uso de bebidas alcoólicas, podem estar facilmente associadas, estudos se fazem necessários para esclarecer melhor essa relação parasito-hospedeiro. Assim, conforme visto em trabalhos anteriores, foi possível demonstrar que essa associação, além de trazer danos ao parasito, também promoveu grave comprometimento hepático e esplênico do hospedeiro. Sabendo-se que o rim é um importante regulador de constituintes do meio interno, através da excreção de substâncias (filtragem do sangue), prevenindo possíveis lesões que afetam o seu funcionamento, tanto a ingestão de etanol como a esquistossomose, que causam injúria renal, podem comprometer o seu pleno desempenho.

1 **OBJETIVOS**

1.1 Objetivo geral

Avaliar o impacto da ingestão de etanol em rins de camundongos esquistossomóticos.

1.2 Objetivos específicos

- a) Analisar se houve alteração morfológica no parênquima renal por meio da histopatologia;
- b) Analisar os rins pela estereologia;
- c) Avaliar a dimensão das estruturas renais pela técnica morfométrica;
- d) Avaliar possíveis alterações no reparo tecidual pelo método de quantificação de colágeno.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Comitê de ética

O presente estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal, do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG), da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), sob o protocolo de número CEUA/011/2019. Todos os procedimentos foram seguidos de acordo com o Guia de Cuidados e Uso de Animais de laboratório (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2011). Em conjunto, seguiuse os princípios adotados e promulgados pela legislação brasileira relativa à criação e uso de animais em atividades de ensino e pesquisa (Marques, Morales e Petroianu, 2009), juntamente com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

2.2 Desenho experimental

O desenho experimental está descrito na (Figura 6). Os camundongos infectados foram submetidos a uma ingestão contínua (28 dias) de 200 μ l de etanol, a uma concentração de 18% (v/v), uma vez ao dia, por gavagem, entre a quinta e a nona semana de infecção. Os animais que não foram expostos ao etanol receberam uma quantidade equivalente de água destilada. Os camundongos foram divididos em quatro grupos distintos: Grupo CNI, não infectado e sem ingestão de etanol (n= 4); Grupo AL, não infectado e com ingestão de etanol (n= 5); Grupo IN, infectado e com a ingestão de etanol (n= 5). Na nona semana de infecção, todos os animais foram submetidos a eutanásia, por asfixia com dióxido de carbono (CO₂) e em seguida, os rins foram cirurgicamente removidos para realização das análises.





Legenda: 1 - Infecção de camundongos com 80 cercarias de *Schistosoma mansoni*, por via subcutânea.; 2 - Ingestão contínua diária (28 dias) de 200 μL de etanol à 18% (v/v), por gavagem; 3 – Na nona semana de infecção, os animais foram eutanasiados em câmara de gás carbônico (CO₂). Os rins foram retirados e fixados em formol à 10% tamponado; 4 - Após a fixação, os rins foram processados em séria alcoólica, seguida de diafanização em xilol, emblocados em parafina liquida, cortados no micrótomo, com espessura de 5μm e os cortes colocados em lâmina histológica; 5 - As lâminas foram coradas com (H&E) e Picrosirius Red, visualizadas ao microscópio.

Fonte: A autora.

2.3 Animais

Foram utilizados camundongos machos adultos da linhagem Swiss Webster, com 60 dias de vida (n = 19), mantidos em gaiolas de polipropileno (40 x 33 cm), em ambiente com temperatura ($21 \pm 1^{\circ}$ C) e umidade ($60 \pm 10^{\circ}$) controladas, expostos a ciclos de luz artificial e escuro (12/12 horas) e exaustor para circulação do ar. Os animais ficaram acomodados no biotério de experimentação, do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (DMIP), da Faculdade de Ciências Médicas (FCM), da UERJ. Foram disponibilizadas água e ração (Nuvilab, Paraná, Brasil) com acesso livre para todos os animais.

2.4 Infecção experimental

Um grupo de animais foi infectado, por via subcutânea, com 80 cercarias da cepa BH (Belo Horizonte) de *S. mansoni*. As cercarias foram fornecidas pelo Laboratório de Malacologia do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, onde o seu ciclo completo de vida é mantido através da passagem em caramujos *Biomphalaria glabrata* e camundongos Swiss Webster (FREIRE et al., 2003).

2.5 Ingestão de Etanol

O etanol à 18% (v/v) foi preparado com etanol absoluto (Proquímios – Rio de Janeiro, Brasil) e água destilada, sendo calculado o volume de etanol necessário:

$$Vi x Ci = Vf x Cf \tag{1}$$

onde Vi é o volume inicial, Ci é a concentração inicial, Vr é o volume final desejado e Cr é a concentração final desejada. Após obter o resultado, este foi subtraído do volume final desejado para calcular o volume necessário de água destilada (BRANDÃO-BEZERRA et al., 2019, 2022).

Os animais receberam uma dose única de 200 µl/animal/dia de etanol à 18%, por gavagem (cânula orogástrica), durante 28 dias consecutivos. A administração do etanol foi iniciada na quinta semana após a infecção, com término na nona semana de infecção. Seguiuse o mesmo protocolo, com água destilada, em animais que não ingeriram etanol (BRANDÃO-BEZERRA et al., 2019; 2022).

2.6 Processamento do tecido e análise histopatológica

Os rins foram clivados e fixados em formalina tamponada com fosfato neutro a 10% (0,1 M, pH 7,2). Em seguida (Quadro 1), foi realizada a desidratação em uma série gradual de etanol (80%, 95% e absoluto), diafanização em xilol e inclusão da amostra em parafina. Os blocos foram cortados em micrótomo (Leica RM2125 RTS, Leica Biosystems), com 5 µm de espessura, colocados em banho maria à 36°C e coletados em lâminas. Após os cortes as lâminas foram coradas, onde a coloração inicia-se no xilol para retirada da parafina, passou por uma série alcoólica do álcool absoluto a álcool 90% e 70% e em seguida foi realizada a coloração. Os cortes histológicos foram corados em Hematoxilina e Eosina (H&E) para análise histopatológica qualitativa. A deposição de colágeno foi mensurada por morfometria em Picrosirius red (microscopia de polarização)(Brandão-Bezerra *et al.*, 2022). As imagens de corte de tecido foram obtidas utilizando um microscópio de campo claro (Olympus BX 53), com câmera Olympus SC100 e depois pelo software Image Pro-Plus (versão 5.0 para Windows, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA).

Quadro 1 - Etapas de preparo de lâmina histológica permanente.

- Fixação Tem como finalidade preservar a morfologia e a composição química dos tecidos – Duração Mínimo de 24h.
- Desidratação Remove a água dos tecidos em série alcoólica crescente, indo do etanol 80%, 95% até o etanol absoluto – Cerca de 15 min em cada série.
- Diafanização Embebe o material em xilol, substância miscível com parafina, começando por uma mistura de etanol absoluto/xilol, na porção 1:1, seguido de dois banhos de xilol Cerca de 15 min em cada série.
- 4. Impregnação Dois banhos de parafina líquida, derretida em estufa à 59°C, permitindo a obtenção de corte no micrótomo, já que a parafina penetra nos espaços intercelulares, impregnando todo o tecido, fornecendo certa dureza ao tecido Cerca de 15 minutos cada banho.
- Inclusão Obtenção do bloco de parafina contendo o material incluído, onde a amostra é posicionada em um molde, contendo parafina e mantido fora da estufa para a solidificação.
- 6. Corte Obtenção de cortes seriados com 5µm de espessuras realizados no micrótomo.

- 7. Coloração Fornecimento de contraste aos componentes do tecido, realizado com retirada da parafina pelo xilol, série alcoólica de álcool etílico decrescente, indo do álcool absoluto a álcool 90% e 70% e após é feita a coloração Tempo varia conforme a ação de cada corante.
- 8. Desidratação Retira a água do tecido a fim de permitir a difusão dos corantes e sua perfeita visualização, iniciando em uma série alcoólica utilizando álcool etílico crescente indo do álcool 70% ao álcool absoluto Tempo variável
- Diafanização pós-coloração Tornar os cortes transparentes para visualização em dois banhos de xilol – Cerca de 5 minutos em cada banho.

10. Montagem – Feita montagem da lâmina com lamínula e bálsamo do Canadá diluído em xilol, na proporção 1:1, mantendo as lâminas histológicas permanente

Fonte: Adaptado (Bezerra, 2016).

Quadro 2 - Finalidade da técnica de coloração empregada.

Hematoxilina e Eosina (H&E) – Estudo e caracterização morfológica, corando o núcleo de roxo e o citoplasma de róseo

Picrosirius - Visualização de fibras colágenas, corando as fibras colágenas de vermelho.

Fonte: Adaptado(Bezerra, 2016).

2.7 Morfometria dos Glomérulos

As avaliações morfométricas foram realizadas em 10 glomérulos aleatórios por animal, por microscopia de campo claro. As imagens foram capturadas por um microscópio (Olympus BX 53), utilizando uma câmera Olympus SC100. Os parâmetros mensurados no *software* Olympus Cell Sens foram: área do glomérulo; área do tufo glomerular; área espaço de Bowman e diâmetro do tufo glomerular. Para obter a área do espaço de Bowman, subtraiu-se área do glomérulo pela área do tufo glomerular(FIORINO PATRICIA, FARAH VERA E FONTENELES MANASSÉS C, 2011)

2.8 Estereologia

A estereologia é uma medida que utiliza a aplicação da geometria probabilística de amostras sistemáticas e randômicas, fornecendo dados quantitativos, concedendo a análise de imagens e de corpos sólidos não apenas em duas dimensões (2D), a partir de comprimento e largura, mas também a profundidade (3D) (GUNDERSEN *et al.*, 1988). Ou seja, a estereologia é caracterizada um conjunto de métodos matemáticos que alcançam parâmetros tridimensionais, bem como aquelas obtidas em cortes obtidas em cortes histológicos preparados para microscopia de luz e eletrônica.

A análise estereológica foi utilizada para determinação da densidade de volume (Vv) ocupada por estruturas renais tanto no córtex quanto na medula. Para avaliar possíveis danos ao órgão foi utilizado um sistema constituído por 36 pontos testes (PT) (D36) sendo calculado sob a fórmula:

$$V_V = \frac{pp}{pt} \%$$
(2)

onde PP representa o número total de pontos que atingem a estrutura e PT representa o número total de pontos na grade. A contagem foi realizada pelo método D36, utilizando objetiva de 20x, por meio da leitura de 10 campos aleatórios do órgão renal de cada animal, onde foram consideradas as seguintes estruturas: córtex; medula; glomérulos; túbulos contorcidos distais (TCD) e proximais (TCP); espaço de Bowman e; possíveis infiltrados leucocitários e vasos.

2.9 Análises estatísticas dos dados

Para a análise estatística foi utilizado o GraphPad InStat3. Para os dados quantitativos da morfometria, estereologia e deposição de colágeno foi usado o teste One-Way ANOVA, com pós teste de Student-Newman-Keuls. As diferenças foram consideradas significativos quando $p \le 0,05$. Os grupos experimentais comparados foram: AL vs CNI; IN vs CNI; INAL vs CNI; INAL vs IN. Os resultados foram apresentados como média ± desvio-padrão.

3 RESULTADOS

3.1 Análise histopatológica do rim

3.1.1 Análise histopatológica renal de camundongos não infectados

Nos animais que não foram infectados e nem submetidos à ingestão de etanol (grupo CNI) foi observado uma arquitetura renal composta por estruturas glomerulares e tubulares na parte do córtex (Figura 7 – a, b, d). Glomérulos constituídos de capilares glomerulares, células epiteliais (podócitos), com distribuição normal de células mesangiais e, ainda contendo a cápsula de Bowman (Figura 7 – a, d). Os túbulos contorcidos proximais apresentaram microvilos, enquanto os túbulos contorcidos distais não mostraram microvilos, porém ambos são forrados com células epiteliais (Figura 7 – b). Além disso, a parte medular apresentou-se com ductos coletores com epitélio simples cúbico (Figura 7 – c).

Figura 7 - Parênquima renal de camundongos não infectados e não submetidos a ingestão de etanol (Grupo CNI).



Legenda: Córtex contendo glomérulo envolvido pela cápsula de Bowman e os túbulos contorcidos proximais (*a*); túbulos contorcidos proximais contendo microvilos no seu interior e túbulos contorcidos distais sem a presença de microvilos (*b*); medula renal (*c*); glomérulo composto por podócitos e células mesangiais (*d*). Seta: cápsula de Bowman; CM: células mesangiais Gl: glomérulo; Me: medula; TCD: túbulo contorcido

distal; TCP: túbulo contorcido proximal. Cortes corados em HE. Barras = 50 μ m (*a*, *b* e *c*); 20 μ m (*d*). Fonte: Autora, 2023.

3.1.2 Análise histopatológica renal não infectados e com ingestão de etanol

Nos camundongos não infectados e submetidos à ingestão de etanol (grupo AL) foi observado desnaturação de proteínas nos túbulos contorcidos proximais e estreitamento da luz tubular (Figura 8 – a, b, c, e, f) que, além disso, apresentaram perda dos microvilos (Figura 8 – a, b) e congestão cortical renal (Figura 8 – b, e, f). Também foi observado a presença de infiltrado leucocitário tanto no córtex quanto na medula. Na medula também se observou desnaturação de proteínas nos túbulos, hiperemia e edema – acúmulo de líquido, na região da medula (Figura 8 – d).



Figura 8 - Parênquima renal de camundongos submetidos à ingestão de etanol à 18%, durante 28 dias consecutivos (Grupo AL).

Legenda: Desnaturação de proteínas (*a*, *b*, *c*, *e* e *f*); perda dos microvilos nos túbulos proximais (*a*, *b*); túbulo contorcido distal normal (*b*); infiltrado leucocitário (*d* e *f*); edema medular (*d*); hiperemia (*f*). *: desnaturação de proteínas; Gl: glomérulo; IL: infiltrado leucocitário; TCD: túbulo contorcido distal; TCP: túbulo contorcido proximal. Cortes corados em HE. Barras = 50 µm (*a*, *b* e *c*); 100 µm (*d*); 20 µm (*e*, *f*). Fonte: Autora, 2023.

3.1.3 Análise histopatológica renal de camundongos infectados e sem ingestão de etanol

Ao analisar a histopatologia do rim de camundongos infectados por *S. mansoni* (grupo IN) foi possível observar alterações tanto no córtex quanto na medula (Figura 9). No córtex, observou-se presença de necrose de células tubulares (Figura 9 – *b*) e de infiltrado leucocitário mononuclear na região dos túbulos contorcidos distais (Figura 9 – *a*). Além disso, foi

visualizado a presença de infiltrado leucocitário em torno do glomérulo e obliteração cápsula de Bowman (Figura 9 – c). Já a medula apresentou sinais de edema e presença de infiltrado leucocitário mononuclear (Figura 9 – d).

Figura 9 - Parênquima renal de camundongos infectados e não submetidos à ingestão de etanol (Grupo IN).



Legenda: Presença de infiltrado leucocitário mononuclear ($a \ c \ e \ d$), destruição e necrose do túbulo contorcido proximal (b), obliteração da cápsula de Bowman ($b \ e \ c$), edema medular (d). Gl: glomérulo; IL: infiltrado leucocitário; Me: medula; Ne: necrose tubular; TCD: túbulo contorcido distal; TCP: túbulo contorcido proximal. Cortes corados em HE. Barras = 50 µm. Fonte: Autora, 2023.

3.1.4 <u>Análise histopatológica renal de camundongos infectados e submetidos à ingestão de</u> <u>etanol à 18%</u>

No grupo infectado e associado à ingestão de etanol (grupo INAL) foi possível observar presença de infiltrado leucocitário mononuclear na área do córtex (Figura 10 - a, b, f) e da medula (Figura 10 - e). Ainda, se verificou presença de desnaturação de proteínas no citoplasma (Figura 10 - b, c, d), além de perda dos microvilos dos túbulos contorcidos proximais (Figura 10 - a, b, c, d). Além dessas alterações, foi observado proliferação das células mesangiais no glomérulo (Figura 10 - f) e que se apresentou mais retraído em relação aos demais grupos estudados (Figura 10 - c, d).



Figura 10 - Parênquima renal de camundongos infectados e submetidos à ingestão de etanol à 18%, durante 28 dias consecutivos (Grupo INAL).

Legenda: Presença de infiltrado leucocitário (*a*, *b*, *e* e *f*); desnaturação de proteínas no citoplasma do túbulo contorcido proximal (*a*, *b*, *c*, *d* e *f*); destruição do interstício renal e túbulo contorcido proximal com perda de microvilos (*c*, *d* e *f*); retração do glomérulo (*c* e *d*); edema na parte medular (*e*); proliferação de células mesangiais no glomérulo (*b*, *c* e *f*). *: desnaturação de proteínas; seta: cápsula de Bowman; CM: células mesangiais; GI: glomérulo; IL: infiltrado leucocitário; Me: medula; TCD: túbulo contorcido distal; TCP: túbulo contorcido proximal. Cortes corados em HE. Barra = 50 μ m (*a*, *b*, *c*, *d* e *e*); 20 μ m (*f*).Fonte: Autora, 2023.

3.2 Morfometria glomérulo e quantificação colágeno

Ao avaliar a morfometria do glomérulo (Tabela 1), foram mensurados a área do glomérulo (que é composta por cápsula de Bowman, espaço de Bowman e tufo glomerular), área do tufo glomerular e área do espaço de Bowman (área total do glomérulo subtraída da área do tufo glomerular).

Em relação à área (μ m²) das estruturas mensuradas, houve aumento na área do glomérulo no grupo AL (+47%; *p* = 0,01), grupo IN (+71%; *p* = 0,001) e grupo INAL (+54%; *p* = 0,001) quando comparados com o grupo CNI. Também, foi observado aumento do tufo glomerular no grupo AL (+42%; *p* = 0,01), grupo IN (+82%; *p* = 0,001) e grupo INAL (+72%; *p* = 0,001) em relação ao grupo CNI. Além disso, o espaço Bowman apresentou aumento no grupo AL (+58%; *p* = 0,05), grupo IN (+51%; *p* = 0,01) e o grupo INAL (+68%; *p* = 0,01) em comparação ao grupo CNI.

No diâmetro do tufo glomerular houve aumento significativo no grupo AL (+21%; p = 0,01), grupo IN (+39%; p = 0,001) e grupo INAL (+42%; p = 0,001) ao serem comparados com o grupo CNI. Além disso, observou-se um aumento no grupo D quando comparado ao grupo AL (+17%; p = 0,001).

Para avaliação da deposição de colágeno, realizou-se a coloração por Picro Sirius red, onde as imagens obtidas por microscopia de campo claro com polarização (figura 12) mostraram um aumento no depósito de colágeno no parênquima renal, no grupo AL (+342%; p = 0,001) e grupo INAL (+349%; p = 0,001) em relação ao grupo CNI (Tabela 1).

Parâmetros	Grupos				
	CNI	AL	IN	INAL	
Área (µm ²)					
Glomérulo	4034±452	$5934 \pm 774^{*}$	6912±1182*	$6227 \pm 718^*$	
Tufo glomerular	2673±268	$3814 \pm 570^{*}$	$4881{\pm}821^{*}$	4614±293*	
Espaço de Bowman	1339±221	2119±247*	$2030 \pm 400^{*}$	2252±428*	
Diâmetro (µm)					
Tufo glomerular	62±3	75±4*	$86 \pm 2^{*}$	$88{\pm}6^{*\&}$	
Colágeno %	$0,90 \pm 1,5$	4,33±1,68*	$0,88 \pm 0,7$	4,40±2,9*	

Tabela 1 - Dados morfométricos e quantificação de colágeno dos rins de camundongos submetidos à ingestão de etanol à 18% ou não (média ±desvio padrão).

Legenda: CNI: Não infectado e sem ingestão de etanol; AL: Não infectado e com ingestão de etanol; IN: Infectado e sem ingestão de etanol; INAL: Infectado e com etanol. Diferença significativa (p < 0,05) em relação ao grupo: CNI (*); AL (&). Teste One-Way ANOVA, com pós teste de Student-Newman-Keuls.



Figura 11 - Fotomografia do rim de camundongos esquistossomótico submetidos à ingestão etanol a 18%, demonstrando o depósito de colágeno no parênquima renal.

Legenda: Distribuição do depósito de colágeno (vermelho). Observa-se distribuição de colágeno ao redor dos glomérulos renais e túbulos. GRUPOS *a*: Não infectado e sem ingestão de etanol; *b*: Não infectado e com

ingestão de etanol; c: Infectado e sem ingestão de etanol; d: Infectado e com etanol. Seta: deposição de colágeno com luz polarizada. (*): Depósito de colágeno sem luz polarizada Cortes corados em Picro Sirius red (polarização). Fonte: Autora, 2023.

3.3 Estereologia D36

O percentual da densidade do volume avaliou as estruturas renais pela estereologia, através do D36 (Tabela 2). No túbulo contorcido proximal houve um menor percentual, o grupo IN (-22%; p = 0,05) e INAL (-22%; p = 0,01) na comparação com o grupo CNI. Na análise do percentual do volume dos túbulos contorcido distal também ocorreu um menor percentual da densidade do volume comparados com o grupo CNI, nos grupos AL (-62%; p = 0,01), IN (-58; p = 0,01) e INAL (-79%; p = 0,01). Na avaliação do percentual da densidade do volume no infiltrado leucocitário houve um aumento significativo em comparação com o grupo CNI, o grupo AL (+14%; p = 0,01), IN (+13%; p = 0,01) e INAL (+16%; p = 0,001). Já no glomérulo, medula, vaso e espaço de Bowman, a densidade percentual de volume não houve diferença nos grupos CNI, AL, IN e INAL (p > 0,05).

Estruturas (%)	Grupos				
	CNI	AL	IN	INAL	
Glomérulo	0,04±0,01	0,05±0,01	0,06±0,01	0,05±0,01	
ТСР	0,40±0,05	0,36±0,02	0,31±0,31*	0,31±0,04*	
TCD	0,24±0,03	0,09±0,09*	0,10±0,10*	0,05±0,10*	
Infiltrado Leucocitário	N. O.	0,14±0,04*	0,13±0,05*	0,16±0,08*	
Vaso	0,04±0,02	0,02±0,01	0,01±0,01	N. O.	
Medula	0,26±0,06	0,30±0,06	0,33±0,05	0,31±0,07	
Espaço de Bowman	0,03±0,03	0,01±0,02	0,07±0,04	$0,04{\pm}0,04$	

Tabela 2 - Densidade do volume determinada por estereologia D36 (%) das estruturas do rim de camundongos infectados ou não e submetidos à ingestão de etanol à 18% (média ± desvio-padrão).

Legenda: CNI: Não infectado e sem ingestão de etanol; AL: Não infectado e com ingestão de etanol; IN: Infectado e sem ingestão de etanol; INAL: Infectado e com etanol. N. O.: Não Observado. TCP: Túbulo contorcido proximal; TCD: Túbulo contorcido distal. *Diferença significativa (p < 0.05) em relação ao grupo CNI. Teste One-Way ANOVA, com pós teste de Student-Newman-Keuls.

4 DISCUSSÃO

O rim é constituído por néfrons que possuem estruturas responsáveis pela filtragem do sangue e produção da urina. Neste órgão há a remoção ativa de substâncias como ácido úrico, amônia, entre outros componentes, como o etanol (RADI, 2019). Além disso, o rim pode ser afetado por doenças não infecciosas, como a diabetes, anemia, acidose metabólica, desnutrição e o alcoolismo e por doenças infecciosas como as causadas por bactérias, fungos e parasitos (WANG E WANG, 2020).

Diferentemente do *S. haematobium* que acomete o sistema geniturinário, levando a formação de processo inflamatório ao redor dos ovos nessa região (ANTWI, ABOAH E SAPRONG, 2015), a esquistossomose mansônica promove danos renais a partir da deposição de imunocomplexos sobre os glomérulos (BARSOUM, 2013).

O uso crônico de etanol gera um estresse oxidativo, afetando a filtragem renal. Isso ocorre devido a oxidação livre de fosfolipídeos celulares, gerando uma sequência de fosfolipídeos oxidativamente truncados. Os leucócitos expressam receptor de ativação inflamatório fosfolipídico de plaquetas (PAF do inglês *Platelet-activating Factor*), e outros fosfolipídeos semelhantes ao PAF fosfolipídico, onde esse receptor acoplado à proteína G, é importante para o metabolismo biológico de PAF, sendo controlado ao mesmo tempo que essa oxidação pode induzir uma inflamação desregulada e ativação de leucócitos. PAF, então, atrai e ativa neutrófilos, que aumentam a fuga da albumina para urina, e isso ocorre pela de produção de ácido hipocloroso (HCIO) (LATCHOUMYCANDANE, NAGY E MCINTYRE, 2015).

Os neutrófilos também sendo o principal repositório da mieloperoxidase, que utiliza H₂O₂ para formar HClO, principal responsável pela morte bacteriana que dependem de oxigênio, porém também danifica o tecido hospedeiro (LATCHOUMYCANDANE, NAGY E MCINTYRE, 2014). A mieloperoxidase possui um papel proeminente em uma série de doenças renais, onde danifica tanto a função glomerular, marcada por má filtração, aumento e extravasamento de albumina, quanto aos danos nos túbulos e interstícios, caracterizados pela liberação de biomarcadores de lesão renal liberados na urina (HOC1)(LI *et al.*, 1994).

De acordo com Latchoumycandane, Nagy e McIntyre (2014), o influxo de leucócitos ocorre devido a mieloperoxidase acumulada nos neutrófilos, ocasionado pelo aumento de mRNA, que codifica o marcador CD64 dos leucócitos ativados, e de integrina específica de leucócitos CD18, tendo em vista o aumento significativo do conteúdo desse mRNA no rim, provocado pela ingestão de etanol. Assim, infiltrado inflamatório e mieloperoxidase ativados

estão relacionados aos danos e as disfunções renais resultantes do catabolismo crônico de etanol. Neste trabalho, na análise histopatológica, no grupo apenas com a ingestão de etanol (grupo AL) foi observado presença de infiltrado leucocitário, tanto na região do córtex, quanto medular. Além disso, foi observado que os túbulos contorcidos proximais mostraram perda de seus microvilos, possivelmente causado pela mieloperoxidase ativa, como visto anteriormente, causa danos aos túbulos, podendo levar ao aumento de quantidades de ureia e creatinina na circulação, e pela diminuição da albumina circulante e seu aumento na urina, marcadores de filtração defeituosa, mostrando que a ingestão de etanol pode prejudicar a filtração (LATCHOUMYCANDANE, NAGY E MCINTYRE, 2014).

A análise histopatológica também mostrou que houve a desnaturação de proteínas nos glomérulos e nos túbulos contorcidos proximais devido a ingestão de etanol. A desnaturação de proteínas pode ocorrer por conta de alterações químicas na molécula da proteína natural, tornando-a insolúvel. Isso pode ser provocado por uma variedade de substâncias, como sais de metais pesados, ácidos complexos, corantes e solventes orgânicos miscíveis em água (álcool etílico e acetona). O etanol, por produzir um metabólito ácido, rompe as ligações de hidrogênio da molécula de proteína, e ao remover a água da sua superfície, facilita a colisão entre moléculas, fazendo com que ela se desintegre (WU, 1995).

A análise estereológica tem como objetivo compreender arranjo estrutural tridimensional interno de tecido biológico e preparação de fatias de tecido para obter resultados diretos e precisos (MANDARIM-DE-LACERDA, 2003). Este método tem sido utilizado para estudar número de glomérulos em várias condições (BENCHIMOL DE SOUZA *et al.*, 2011; MIRANDA *et al.*, 2015; SOUZA, de *et al.*, 2016). Em relação aos dados estereológicos, apesar de não ter ocorrido alterações na densidade de volume de glomérulos, foi observado que ocorreu uma diminuição na densidade de volume dos túbulos contorcidos distais no grupo com etanol, infectado e no grupo infectado e com ingestão de etanol, já os túbulos contorcidos proximais mostraram diminuição no grupo infectado e no grupo infectado e com ingestão de etanol, onde esses resultados quantitativos podem indicar perda na função dos túbulos, bem como aumento de tecido fibrótico (CHARGUI *et al.*, 2011; HAYSLETR, KASHGARIAN E EPSTEIN, 1968). Com isso, não promoveu alterações nos números dos glomérulos, porém sim nas estruturas dos túbulos renais, isto pode ocorrer devido a perda de microvilos, afetando a sua reabsorção, levando assim a perda da função.

Na análise morfométrica renal dos camundongos, observou-se aumento em todos parâmetros e grupos estudados: área do glomérulo; área tufo glomerular; área espaço de Bowman e diâmetro do tufo glomerular. Estes parâmetros mensurados são estruturas importantes, pois tem como função controlar a quantidade de líquidos do organismo, a eliminação de resíduos do sangue e retorno de substâncias úteis, regulação do pH sanguíneo e hidroeletrolítico, controla a pressão arterial, produção de urina e a de resíduos tóxicos, ureia, creatinina e ácido úrico que estão relacionados com a perda da função renal (MCMAHON, 2016). E esse aumento em todos os parâmetros pode estar ligado à hipercelularidade, hiperemia ou esclerose glomerular (DAIMON E KONI, 1998).

Na esquistossomose, a injúria renal é mediada por imunocomplexos que são formados por antígenos solúveis do ovo e são depositados nos glomérulos. Ocorre na presença de hipertensão portal, quando a circulação colateral desvia os antígenos esquistossomóticos do ovo, passa para circulação geral, e assim chegam aos rins. Ao alcançar este órgão, os imunocomplexos se depositam nos glomérulos e provocam a lesão renal, devido a uma sequência de respostas imunes, como ativação do sistema complemento, quimiotaxia de macrófagos e neutrófilos e agregação plaquetária. Todo esse evento ocorre já na forma hepatoesplênica da doença (FONTES E CANUTO, 2017A).

A quantificação de colágeno no parênquima renal no grupo que ingeriu etanol teve um aumento na quantidade no depósito de colágeno, o que pode levar a uma fibrose tubulointersticial, que através da presença de citocinas, fatores de crescimento, leucócitos, ativação de fibroblastos, transição do epitélio mesenquimal, irão contribuir para o desenvolvimento da fibrose tubulointersticial progressiva (DUFFIELD, 2014; SINGH E MATHEW, 2022).

Em todos os grupos estudados foi possível observar um infiltrado de leucócitos tanto no córtex quanto na medula e destruição da membrana basal glomerular (cápsula de Bowman). Conforme já descrito na literatura, o acometimento renal é caracterizado pela deposição de imunocomplexos sobre os glomérulos, onde a localização desses componentes determina a lesão glomerular denominada glomerulopatia. Esses complexos depositados causam uma reação inflamatória no glomérulo que desencadeia o influxo de leucócitos. A destruição da cápsula de Bowman é uma característica da glomerulonefrite rapidamente progressiva crescente mediada por imunocomplexos. Estes são formados por migração de monócitos/macrófagos dentro da cápsula de Bowman, onde ocorre obliteração do espaço capsular, comprimindo o glomérulo, conforme observado nos grupos apenas com a infecção (ALPERS E FOGO, 2013).

Ainda, no grupo somente com a infecção houve também necrose no túbulo contorcido proximal, sugerindo uma nefrite tubulointersticial, doença inflamatória que envolve, principalmente, os túbulos renais e o interstício. A lesão tubular aguda é caracterizada pelo dano

às células do epitélio tubular e clinicamente pelo declínio da função renal. Esta lesão tubular, ocorre devido a Insuficiência Renal Aguda (IRA) que é definida como perda da função renal, provocando acúmulo de substâncias nitrogenadas (ureia e creatinina), acompanhada ou não da diminuição da diurese. A IRA é causada por diversos fatores, como obstrução do trato urinário, que é denominada IRA pós-renal, ou por diminuição da perfusão renal com manutenção da integridade dos vasos, glomérulos e túbulos renais, a IRA pré-renal (COSTA, VIEIRA-NETO E NETO, 2003).

A necrose tubular aguda é a principal causa de IRA intrínseca renal, que pode ocorrer por isquemia (CHRONOPOULOS, CRUZ E RONCO, 2010). Foi relatado que a necrose tubular se associa com IRA em pacientes com doença glomerular, principalmente, naqueles com nefropatia por IgA com risco de progressão da IRA (TAVARES, 2011). A isquêmica decorre da irrigação sanguínea que resulta de um comprometimento da entrega de oxigênio, nutrientes e remoção de resíduo do túbulo proximal. Ocorre uma incompatibilidade entre o suprimento local de oxigênio no tecido tubular e a demanda e o acúmulo de resíduos do metabolismo. Durante esse evento, há expressão de moléculas de adesão, infiltração de leucócitos e liberação de citocinas geradas por células tubulares isquêmicas. Os leucócitos obstruem a microcirculação e liberam citocinas pró-inflamatórias, onde a liberação dessas citocinas desencadeia a indução de óxido nítrico, que forma espécies reativas de oxigênio que danificam o DNA das células tubulares, causando assim morte por apoptose e/ou necrose tubular aguda (BOROS E BROMBERG, 2006). Além disso, também foi observado um edema na região da medula, sugerindo que, devido a necrose, a poliúria por conta da redução da reabsorção tubular, ou seja, excesso de sódio e água nos túbulos, faz como que estes extravasem para o espaço intersticial provocando o edema (LUNN, 2011).

A infecção esquistossomótica com a ingestão de etanol mostrou proliferação de células mesangiais e glomérulo retraído em relação aos demais grupos estudados. A proliferação mesangial é uma característica da glomerulonefrite membranoproliferativas (MPGN), sendo classificado como MPGN I (proliferação mesangial com depósitos imunes) e MPGN II (com menos proliferação mesangial e com depósitos densos na MBG), MPGN III (mediados por imunocomplexos e mediados por complemento). A MPGN mediada por imunocomplexos é resultante da deposição destes nos glomérulos, onde ativam a via clássica do complemento e a deposição de componentes da via clássica e da via terminal no mesângio e ao longo das paredes capilares (GONÇALVES, FONTES E CANUTO, 2017b).

A proliferação das células mesangiais e destruição da integridade glomerular, que se torna mais obliterado, seguido da diminuição da função glomerular, é uma característica da

doença renal crônica (HARENDZA, HELMCHEN E STAHL, 1999). Acredita-se que os danos que persistem, após a lesão renal aguda, levam a uma progressão da doença renal crônica, que envolve uma cascata de mecanismos, incluindo hipertensão portal, hiperfiltração glomerular, hipertrofia e atrofia tubular, fibrose tubulointersticial, esclerose glomerular progressiva e infiltrado de células leucocitárias (EDDY, 2005). Tanto a ingestão de etanol, a infecção esquistossomótica, quanto a associação apresentaram infiltrado de leucócitos, sugerindo então que, com a progressão da inflamação induzido por ambos estímulos, pode acarretar alterações, danificando drasticamente a integridade renal.

CONCLUSÃO

Concluiu-se que a infecção esquistossomótica com a associação da ingestão de etanol alterou a integridade do tecido renal, aumentando o processo inflamatório, acarretando sérios danos morfofuncionais ao órgão, visto que mostrou alterações na estrutura renal tanto com a ingestão do etanol quanto na infecção esquistossomótica.

REFERÊNCIAS

ALAMARTINE, E. *et al.* The use of the oxford classification of IgA nephropathy to predict renal survival. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 6, n. 10, p. 2384–2388, 2011.

ALPERS, C. E.; FOGO, A. B. O rim e seu Sistema coletor. *Em*: **Patologia Básica**. 9. ed. Rio de janeiro: Elsevier, 2013. p. 517–549.

ANDRADE, Z. A. Schistosomal hepatopathy. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 5, p. 51–57, 2004.

ANDRADE, Z. A.; ROCHA, H. Schistosomal glomerulopathy. Kidney International, v. 16, n. 1, p. 23–29, 1979.

ANDRADE, Z. DE A. A patologia da Esquistossomose humana. *Em*: Schitosoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de janeiro: Editora FIOCRUZ, 2008. p. 546–568.

ANTWI, S.; ABOAH, K.; SAPRONG, C. The unacknowledged impact of urinary schistosomiasis in children: 5 cases from Kumasi, Ghana. **Ghana Medical Journal**, v. 48, n. 4, p. 228, 11 fev. 2015.

BARSOUM, R. S. Urinary Schistosomiasis: Review. Journal of Advanced Research, v. 4, n. 5, p. 453–459, set. 2013.

BENCHIMOL DE SOUZA, D. *et al.* Effects of Immobilization Stress on Kidneys of Wistar Male Rats: A Morphometrical and Stereological Analysis. **Kidney and Blood Pressure Research**, v. 34, n. 6, p. 424–429, 2011.

BEZERRA, L. B. Efeito da ingestão de etanol na infecção esquistossomótica murina experimental. Rio de Janeiro: Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2016.

BOROS, P.; BROMBERG, J. S. New cellular and molecular immune pathways in ischemia/reperfusion injury. **American Journal of Transplantation**, v. 6, n. 4, p. 652–658, 2006.

BRANDÃO-BEZERRA, L. *et al.* Long-term ethanol intake causes morphological changes in *Schistosoma mansoni* adult worms in mice. **Experimental Parasitology**, v. 203, n. September 2018, p. 30–35, ago. 2019.

_____. Impact of Acute Schistosomiasis Mansoni and Long-Term Ethanol Intake on Mouse Liver Pathology. **SSRN Electronic Journal**, v. 242, n. April, 2022.

BRASIL. **VIGILÂNCIA DA ESQUISTOSSOMOSE MANSONI Diretrizes Técnicas**. 4. ed. Brasília: Ministério da saúde , 2014.

BRASIL. **Vigilância da Esquistossomose mansoni : diretrizes técnicas**. 3. ed. Brasília: Editora MS, 2014.

BRASIL. Doenças tropicais negligenciadas. *Em*: Ministério da saúde: Boletim Epidemiológico - Secretaria de Vigilância em Saúde , 2021.

BULGER, R. E. O sistema urinário. *Em*: **Histologia**. 4. ed. Rio de janeiro: Guanabara Koogan, 1981. p. 700.

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 São Paulo**, v. 35, n. 5, p. 391–394, out. 1993.

CDC Center for Disease Control and Prevention., 2019.

CHARGUI, A. *et al.* Cadmium-Induced Autophagy in Rat Kidney: An Early Biomarker of Subtoxic Exposure. **Toxicological Sciences**, v. 121, n. 1, p. 31–42, maio 2011.

CHRONOPOULOS, A.; CRUZ, D. N.; RONCO, C. Hospital-acquired acute kidney injury in the elderly. **Nature Reviews Nephrology**, v. 6, n. 3, p. 141–149, 2 mar. 2010.

COSTA, J. A. C. DA; VIEIRA-NETO, O. M.; NETO, M. M. Insuficiência renal aguda. **Medicina (Ribeirao Preto. Online)**, v. 36, n. 2/4, p. 307, 30 dez. 2003.

DAIMON, S.; KONI, I. Glomerular enlargement in the progression of mesangial proliferative glomerulonephritis. **Clinical nephrology**, v. 49, n. 3, p. 145–52, mar. 1998.

DARÉ, B. LE; LAGENTE, V.; GICQUEL, T. Ethanol and its metabolites: update on toxicity, benefits, and focus on immunomodulatory effects. **Drug Metabolism Reviews**, v. 51, n. 4, p. 545–561, 2 out. 2019.

DUFFIELD, J. S. Cellular and molecular mechanisms in kidney fibrosis. Journal of Clinical Investigation, v. 124, n. 6, p. 2299–2306, 2 jun. 2014.

EDDY, A. A. Progression in Chronic Kidney Disease. v. 12, n. 4, p. 353-365, 2005.

EID, R. A. *et al.* Ultrastructural changes of kidney in *Schistosoma mansoni*-infected mice. **Ultrastructural Pathology**, v. 41, n. 5, p. 320–326, 3 set. 2017.

EL-SHERIF, A. K.; BEFUS, D. Predominance of IgA deposits in glomeruli of *Schistosoma mansoni* infected mice. **Clinical and experimental immunology**, v. 71, n. 1, p. 39–44, jan. 1988.

FALCÃO, H. A.; GOULD, D. B. Immune Complex Nephropathy in Schistosomiasis. Annals of Internal Medicine, v. 83, n. 2, p. 148, 1 ago. 1975.

FIORINO PATRICIA; FARAH VERA; FONTENELES MANASSÉS C. Estudo das alterações funcionas e morfométricas renais associadas ao consumo de uma dieta hiperlilídica em ratos. São Paulo.

FREIRE, N. *et al.* A comparative parasitologic study on Biomphalaria glabrata snail and C3H/He mice infected with human and murine isolates of Schistosoma mansoni derived from

Sumidouro, Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 6, p. 783–787, set. 2003.

GONÇALVES, F. O.; FONTES, T. M. DE S.; CANUTO, A. P. P. S. L. *Schistosoma mansoni* associated glomerulopathy with IgA mesangial deposits: case report. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 39, n. 1, p. 86–90, 2017a.

_____. *Schistosoma mansoni* associated glomerulopathy with IgA mesangial deposits: case report. Jornal brasileiro de nefrologia : 'orgao oficial de Sociedades Brasileira e Latino-Americana de Nefrologia, v. 39, n. 1, p. 86–90, 1 mar. 2017b.

GRAHAMMER, F. New structural insights into podocyte biology. Cell and Tissue Research, v. 369, n. 1, p. 5–10, 10 jul. 2017.

Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Washington, D.C.: National Academies Press, 2011.

GUNDERSEN, H. J. G. *et al.* Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. **APMIS**, v. 96, n. 1–6, p. 379–394, jan. 1988.

HARENDZA, S.; HELMCHEN, U.; STAHL, R. A. K. Nephrology Dialysis Transplantation Extracellular matrix deposition and cell proliferation in a model of chronic glomerulonephritis in the rat. p. 2873–2879, 1999.

HARRIS, P. S. *et al.* Chronic ethanol consumption induces mitochondrial protein acetylation and oxidative stress in the kidney. **Redox Biology**, v. 6, p. 33–40, dez. 2015.

HAYSLETR, J. P.; KASHGARIAN, M.; EPSTEIN, F. H. Functional Correlates of Compensatory Renal Hypertrophy. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 47, p. 747–782, abr. 1968.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. HISTOLOGIA BASICA . 13. ed. RIO DE JANIERO: GUANABARA KOOGAN, 2017.

KOURKOUMPETIS, T.; SOOD, G. Pathogenesis of Alcoholic Liver Disease. Clinics in Liver Disease, v. 23, n. 1, p. 71–80, fev. 2019.

KURIHARA, H.; SAKAI, T. Cell biology of mesangial cells: the third cell that maintains the glomerular capillary. **Anatomical Science International**, v. 92, n. 2, p. 173–186, 24 mar. 2017.

LATCHOUMYCANDANE, C.; NAGY, L. E.; MCINTYRE, T. M. Chronic ethanol ingestion induces oxidative kidney injury through taurine-inhibitable inflammation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 69, p. 403–416, abr. 2014.

_____. Myeloperoxidase formation of PAF receptor ligands induces PAF receptor-dependent kidney injury during ethanol consumption. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 86, p. 179–190, set. 2015.

LI, J. Z. *et al.* Polymorphonuclear leukocytes increase glomerular albumin permeability via hypohalous acid. **Kidney International**, v. 46, n. 4, p. 1025–1030, 1994.

LUNN, K. F. The Kidney in Critically Ill Small Animals. Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice, v. 41, n. 4, p. 727–744, jul. 2011.

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

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.; MORALES, M. M.; PETROIANU, A. Brazilian law for scientific use of animals. Acta Cirurgica Brasileira, v. 24, n. 1, p. 69–74, fev. 2009.

MCMAHON, A. P. Development of the Mammalian Kidney. p. 31-64, 2016.

MCMANUS, D. P. *et al.* Schistosomiasis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 1, 1 dez. 2018.

MINCIS, M.; MINCIS, R. Doença hepática alcoólica: Diagnóstico e Tratamento. **Prática Hospitalar**, v. 48, p. 113–118, 2006.

MIRANDA, F. J. B. *et al.* Experimental infection with the Toxoplasma gondii ME-49 strain in the Brazilian BR-1 mini pig is a suitable animal model for human toxoplasmosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 1, p. 95–100, fev. 2015.

NDISANG, J. F. Glomerular Endothelium and its Impact on Glomerular Filtration Barrier in Diabetes: Are the Gaps Still Illusive? **Current Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1525–1529, 7 maio 2018.

NEVES, D. P. Parasitologia humana. 16. ed. São paulo: Atheneu, 2016.

OLIVEIRA, A. S. DE *et al.* Efeitos do alcoolismo crônico na morfologia renal de ratos Wistar. **Revista Brasileira de Clínica Médica**, v. 9, n. 1, p. 46–49, 2011.

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, 1981.

POLLAK, M. R. *et al.* The Glomerulus. Clinical Journal of the American Society of Nephrology, v. 9, n. 8, p. 1461–1469, ago. 2014.

PRASAD, N.; PATEL, M. R. Infection-Induced Kidney Diseases. Frontiers in Medicine, v. 5, 28 nov. 2018a.

_____. Infection-Induced Kidney Diseases. **Frontiers in Medicine**, v. 5, p. 1–11, 28 nov. 2018b.

RADI, Z. A. Kidney Pathophysiology, Toxicology, and Drug-Induced Injury in Drug Development. **International Journal of Toxicology**, v. 38, n. 3, p. 215–227, 7 maio 2019.

RAFAEL VIEIRA. **Histologia do rim**. Disponível em: https://www.kenhub.com/pt/library/anatomia/histologia-do-rim. Acesso em: 12 jun. 2023.

ROSA, A. A. DA. Alterações no tecido esplênico de camundongos esquistossomóticos submetidos à ingestão de etanol. Rio de Janeiro: Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2019.

SINGH, B. M. K.; MATHEW, M. Epithelial-Mesenchymal Transition and its Role in Renal Fibrogenesis. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 65, 2022.

SOUZA, D. B. DE *et al.* The sheep as a model for healing studies after partial nephrectomy. **Journal of Surgical Research**, v. 200, n. 1, p. 387–391, jan. 2016.

SOUZA, F. P. C. DE *et al.* Schistosomiasis mansoni: general aspects, immunology, pathogenesis and natural history: [review]. **Rev. Soc. Bras. Clín. Méd**, v. 9, n. 4, p. 300–307, 2011.

SUZUKI, H. *et al.* The Pathophysiology of IgA Nephropathy. Journal of the American Society of Nephrology, v. 22, n. 10, p. 1795–1803, out. 2011.

TAVARES, M. B. Insuficiência renal aguda em pacientes com doença glomerular: aspectos histológicos e papel da necrose tubular aguda. Salvador: Universidade Federal da Bahia Fundação Oswaldo Cruz, 2011.

WANG, X.; GARRETT, M. R. Nephron number, hypertension, and CKD: physiological and genetic insight from humans and animal models. **Physiological Genomics**, v. 49, n. 3, p. 180–192, 1 mar. 2017.

WANG, Y.; WANG, J. Modelling and prediction of global non-communicable diseases. **BMC Public Health**, v. 20, n. 1, p. 822, 1 dez. 2020.

WHO. **Alcohol**. Disponível em: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/alcohol. Acesso em: 3 ago. 2023.

____. World Health Organization: Schistosomiasis. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/schistosomiasis>. Acesso em: 20 ago. 2023.

WU, H. Studies on denaturation of proteins xiii. a theory of denaturation. Advances in **Protein Chemistry**, v. 46, n. C, p. 6–26, 1995.

ZAGO-GOMES, M. P. *et al.* Prevalence of intestinal nematodes in alcoholic patients. v. 35, n. 6, p. 571–574, 2002.

ZHAO, J.-H. Mesangial Cells and Renal Fibrosis. p. 165–194, 2019.