



Universidade Federal de Pernambuco  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde  
Laboratório de Imunopatologia Prof. Keizo Asami

RAFAEL JOSÉ RIBEIRO PADILHA

**Caracterização ultraestrutural dos componentes bioquímicos da  
região tegumentar e subtegumentar de verme adulto macho de  
*Schistosoma mansoni* (SAMBON,1907)**

Recife, 2013

**Rafael José Ribeiro Padilha**

**Caracterização ultraestrutural dos componentes bioquímicos da região  
tegumentar e subtegumentar de verme adulto macho de  
*Schistosoma mansoni* (SAMBON,1907)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, do Laboratório de Imunopatologia Prof. Keizo Asami da Universidade Federal de Pernambuco, como pré-requisito para a obtenção do título de Mestre em Biologia Aplicada à Saúde.

**Orientador:**

**Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho**

**Co-orientadores:**

**Prof. Dr. Luiz Carlos Alves**

**Profa. Dra. Maria Elizabeth Cavalcante Chaves**

**Recife, 2013**

Catálogo na Fonte:  
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

A848c Padilha, Rafael José Ribeiro

Caracterização ultraestrutural dos componentes bioquímicos da região tegumentar e subtegumentar de verme adulto macho de *Schistosoma mansoni* (SAMBON, 1907) / Rafael José Ribeiro Padilha. – Recife: O Autor, 2013.

70 folhas: il.

Orientador: José Luiz de Lima Filho

Coorientadores: Luiz Carlos Alves; Maria Elizabeth Cavalcante Chaves

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Biologia Aplicada à Saúde, 2013.

Inclui bibliografia e anexo

1. *Schistosoma mansoni* 2. Citoquímica I. Lima Filho, José Luiz de (orientador) II. Alves, Luiz Carlos (coorientador) III. Chaves, Maria Elisabeth Cavalcante (coorientadora) IV. Título.

592.48

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2013-102



**Universidade Federal de Pernambuco**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde**  
**Laboratório de Imunopatologia Prof. Keizo Asami**

**Reitor**

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

**Vice-reitor**

Prof. Dr. Sílvio Romero Marques

**Pró-reitor para Assuntos de Pesquisa e Pós-graduação**

Prof. Dr. Francisco de Sousa Ramos

**Diretor do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami**

Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho

**Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde**

Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior

**Recife/2013**

## FOLHA DA APROVAÇÃO

**Nome:** Rafael José Ribeiro Padilha

**Título:** Caracterização ultraestrutural dos componentes bioquímicos da região tegumentar e subtegumentar de verme adulto macho de *Schistosoma mansoni* (SAMBON,1907)

**APROVADA EM 27/02/2013**

**Banca examinadora:**

**Titulares:**

---

**Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho**

**Deptº de Bioquímica – UFPE.**

---

**Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho**

**Deptº de Patologia – UFPE.**

---

**Profa. Dra. Valéria Wanderley Teixeira**

**Deptº de Morfologia e Fisiologia Animal – UFRPE.**

**Suplentes:**

---

**Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior**

**Deptº de Bioquímica – UFPE.**

---

**Prof. Dr. Fábio André Brayner dos Santos**

**Deptº de Parasitologia – CPqAM/FIOCRUZ.**

**Dedico esta dissertação.....**

***A minha esposa, Maria Gorete, a meus filhos Rafael e Renata Meireles, meus pais Rafael e Leyde Padilha e a todos da minha família, por serem o meu apoio em todos os momentos.***

***Ofereço***

***Aos meus amigos Luiz C. Alves e Fábio Brayner, pelo esforço e dedicação, que fizeram acreditar que eu poderia ir sempre além, e a Marília Cavalcanti por sua amizade.***

*“O que sempre foi consequência,*

*Um dia tornou-se sonho,*

*Ontem foi objetivo,*

*E hoje é realidade”*

*André Faires.*

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente a “**DEUS**”, pela força, paz e serenidade nos momentos necessários;

Aos meus pais Rafael e Leyde Padilha, que dedicaram todos os seus esforços a minha criação e educação, minha querida amada esposa Maria Gorete, meus filhos amados Rafael Meireles e Renata Meireles, meu sogro José Meireles e a minha sogra dona Cila, meu muito obrigado, por não medir esforços e permitir que eu alcançasse mais uma etapa da minha vida;

Ao meu orientador Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho, por ter me recebido e confiado, meus co-orientadores Prof. Dr. Luiz Carlos Alves e Profa. Maria Elizabeth Cavalcante Chaves terem aceitado, meu muito obrigado, por fazerem me sentir bem, por estarem sempre dispostos a partilharem conhecimentos, multiplicando meus, por sempre estarem disponíveis quando necessitados, pela paciência que tiveram comigo, pelos momentos de harmonia vividos no laboratório e pelo incentivo e apoio que tornaram possíveis a produção deste trabalho;

Ao coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde (PPGBAS), Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior, ter incentivado a fazer graduação e pós-graduação, por ter mim recebido no programa de braços abertos, por sempre me fazer à vontade, por ser solícito a qualquer momento e pela sua alegria contagiante, e em nome deles a todos os professores do programa e secretária senhora Eliete Rodrigues meu muito obrigado;

A todos os meus amigos e colegas da PPGBAS-LIKA (2011/2013);

Meu agradecimento em especial ao professor Aggeu Magalhães de Godoy Filho, no início dos trabalhos no LIKA, quando veio meu interesse pelo o estudo da esquistossomose.

A todos meus amigos e colegas de trabalho do LIKA: Vera Santana, Edson Silva, Nadja Pádua, Paulo Feita, Otaviano Costa, Moisés Melo, Oscar Brasil, Antônio Cláudio Aguiar, Ilma Santos, Karen Cavalcanti, Conceição Chimenes, Paulina Albuquerque, Kilma Coelho, Maria Helena Madruga, Felipe Santana, Marina Cartaxo, Sandra Barbosa, Fátima Diniz e Carmelita Cavalcanti, por ser a minha segunda família;

Aos meus amigos e amigas dos laboratórios do LIKA: Roberto Afonso, Pabyton Gonçalves, André Martins, Marcela Wanderley, Danielly Santos, Gustavo Nascimento, Milton Compagnon, Alessandro Albertini, Bruno Galvão, Mariana Cabrera, Camila Braga, Marília Cadena, Luiza Rayanna Lima, Natália Cibele, Anderson Paulo, Ariadna Barra, Camila Galvão, Eriton Príon, Artur Clark, Catarina Addobbati, Thiago Matos, Tati Ferraz, Franklin Magliano, Gabriela Ayres, Sérgio Santos, Amanda Teixeira, Humberto Bertão, Guilherme Messias, Danielle Padilha, Diego Albuquerque, Sinara Almeida, Millena Ferraz, Renata Raele, Hannah Lyra, Larissa Morgana, João Pontes, Laércio Brandão, Thiers Campos, Larissa Chaves, Marcela Araújo, Rafaella Siqueira, Rebeca Torelli, Sabrina Lima, Luis Weinstein, Rafinha Nascimento, Mirella Monteiro, Hannah Lyra, Mikaella Santos, Camila Silva, Amanda U'choa, M<sup>a</sup>. Eduarda Vasconcelos, Rodrigo Fragoso, Marcos Duque, Joyce Gouveia, Samy Steinberg, Roberta Gondon, Adriana Carneiro, Tiago Arruda, Danielly Cantarelli, André Aires, Rodrigo Fragoso, Juliana Melo, Flávia Regina, Fernanda Rodrigues, Anselmo Kamada, Heidi Lacerda, Antônio Campos, Juliana Brandão, Juliana Vasconcelos, Rafaela Batista, Luciana Tavares, Natália Alencar, Jacqueline Silva, Priscila Serafin, Ronaldo Celerino, Ronald Moura, Fábio Fideles, Catarine Cavalcanti, Larissa Matos, Roberta Ventura, Deborah Zanforlin, M<sup>a</sup>. Amélia Borba (Mel), Jeyselaine Lima, Keila Paz, Viviane Moraes, Dayse de DEUS, Geórgia

Cahú, Mariana Arruda, Renata Reale, Eliabi Pereira, Renata Vieira, Bruno Trajano, Rodrigo Pimentel, Catarina Michelle, Rafael Acioli, Marcela Oliveira, Ana Lygia Câmara, Jéfferson Almeida, Marek Henryque, Kleiton Borges (Patativa), Eduardo Ramalho, Juliana Nunes, Suzan Diniz, Larissa Avellar, Manuella Souza, Lúcia Patrícia, Rodrigo Heráclio, Lilian Pimentel, Juan Coelho, Wessulla Ribeiro (Sula), Priscyla Andrade, Paula Vasconcelos, Nara Barbosa, João Quirino, Fernando Caldeira, Esmeralda Souza, Jean Sauvé, Pedro Tenório, José Lima, Adriana Andrade, Natália Moraes, Alice Bezerra e Thacianna Costa;

A todos os professores e professoras que fazem e já fizeram parte do LIKA: Maria do Carmo Pimentel, Maria da Paz, Nereide Magalhães, Cinthia Rocha, Noêmia, Mariane Lira, Isabella Macário, Valdenia Souza, Mônica Camelo, Vláudia Costa, Célia Castro, Rosangela Frade, Ana Porto, Rosa V. Amorim, Ranilson Bezerra, Luciano Montenegro, Paulo Miranda, Paula Sandrin, Ana Carneiro Leão, Rosali, João Ricardo, Francisco Amâncio, Sérgio Crovella, José Figueiredo, Marcelo Magalhães, Ieda Linhares, Paulo Padovan, Luiz C. Ferreira, Neide Shinohara, Rosa Druta, Armando Marsden, Mario Ribeiro, Eduardo Beltrão, Paulo Andrade, Aline Elesbão, Valfrido Santana Lucas Brandão, Rafael Guimarães, Danyelly Brunaska, Henrique Castelletti, Eridan Coutinho, Paloma Medeiros, Galba Takaki, Ivanise Aca, Laura M. Paiva, Chyntia Rayol, Vera Magalhães, Isaíaras Padovan, Orleide Pires, Elizabeth Malagueno, Eridan Coutinho, Cleide Miranda e Rosangela Coelho;

O meu agradecimento em especial aos Professores Doutores Luiz C. Alves e Fábio Brayner, nas orientações dos trabalhos e na cobrança das tarefas determinadas por eles, meu muito obrigado! Agradeço a minha amiga Professora Doutora Marília Cavalcanti (UFPB) pelos seus incentivos e colaboração;

Aos amigos do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães – CpqAM / FIOCRUZ:  
Raimundo Pimentel, Fábria Cristina, Elisângela Dias, Vlademir Gomes, Roné Araújo,  
Leonardo Dutra, Yara Nakasawa, Mineo Nakasawa, Wilson Nascimento, Viviane  
Carvalho, Cássia Docena e Malos Chaves;

A todos meus amigos e amigas do grupo LBCM do Departamento de  
Parasitologia – CPqAM / FIOCRUZ e LIKA: Gabriel Gazzoni, Adriana Souza, Alberon  
Ribeiro, Amanda Aliança, Ana Paula Sampaio, Dyana Leal, Eduarda Mangureira,  
Elverson Soares, Catarina Fernandes, Eveline Azevedo, Everton Moraes, Fernanda  
Cristina, Gladiston da Rocha, Grasielle Vaz, Jorge Ricardo, Leandro Seara,  
Willames Brasileiro, Cristiane Brito, Josué Araújo e Tatiana Silva que durante esses  
dois anos me propiciaram momentos de construção e aprendizado, e que de algum  
modo contribuíram para o meu crescimento o meu muito obrigado;

Aos meus vizinhos: Felipe Aguiar, Romilda Borges, Roberta Aquino, Daniel  
Aguiar, Elias Marcolino, Rubenita Marcolino, Célia Guerra, Luzinete Campos,  
Vlademir Júnior e Cibele Araújo, Eliseu Lourenço e Iuara Oliveira;

As minhas tias Inês de Araújo, Laurenita Paiva, Ledna Paiva, Lauriene Paiva,  
Vera Padilha, Litinha e Lourdes Paiva;

A meus Tios Roberio Padilha, Marcos Paiva, Valter Paiva, Lourivan Paiva;

As minhas irmãs, Consuelo Padilha, Helena Padilha, Rosa Cristina Padilha;

Meus sobrinhos (as): Raphaella Padilha, Roberto Calheiro, Roberta Padilha,  
Rosaleide Padilha, Juliana Padilha, Mariana Padilha, Heitor Ventura e Hugo Ventura;

Meus cunhados Josivan, Roberto Ventura e Enéas Ramos,

A minha nora Thalita Dutra e meu genro Carlos Thiago;

Meus compadres Reginaldo Anjo, Oscar Bastos, Rui Cruz, Inaldo Pinto, Mario  
Gomes, Edson Brasileiro, José Ridalvo, Fábio Oliveira e Carlos César (Caca);

As minhas comadres Suely Mendes, Poracy Bastos, Zizi Mendes, Fátima Brasileiro, Sônia Cruz, Zizi Chaves, Iraildes (Lila), Maria José (Nega) e Carmelita;

A família EcC da igreja São Sebastião do Cordeiro, representada pelo Pe. Oscar Martins, que me receberam de braços abertos;

A Carolina Pereira, Elizabete Alves e Joselma Silva (recepção), Sarah Nascimento (Xerox) do CPqAM / FIOCRUZ;

Ao pessoal da manutenção, os seguranças do CPqAM / FIOCRUZ e todos aqueles que de uma forma ou de outra ajudarão na minha formação.

**Meu muito obrigado a todos vocês e “DEUS” abençoem todos vocês!**

## RESUMO

Uma alternativa para identificar componentes bioquímicos necessários ao estabelecimento e manutenção do parasito no hospedeiro pode ser obtida através da citoquímica. Foi realizado um estudo citoquímico ultraestrutural do verme adulto macho de *S. mansoni* com 25, 45 e 130 dias. Para localizar sítios de cálcio utilizamos a técnica de Hepler e para evidenciar grupamentos aniônicos empregamos a ferritina cationizada, além do tratamento enzimático com condroitinase, tripsina e neuraminidase. Para a identificação de lipídios insaturados foi utilizada, a técnica do Tampão Imidazol e para localizar proteínas básicas empregamos às técnicas do Ácido Fosfotúngstico (PTA) e da Prata Amoniacal. A localização de sítios de cálcio mostrou-se bastante uniforme, demarcando os espaços internos, principalmente, o tecido muscular do verme, independente da sua idade. As amostras tratadas com ferritina cationizada apresentaram uma forte marcação na membrana do tegumento e glicocálice a intensidade da marcação aumentou de acordo com a idade do verme. O tratamento das amostras com a neuraminidase não alterou o padrão de marcação, enquanto com a tripsina marcou moderadamente a superfície do trematóide. Já, o tratamento com a condroitinase resultou em marcação pontual na superfície do verme. Foi observada a presença de lipídios insaturados de formato globular em toda a região tegumentar e subtegumentar do verme, sendo maior a concentração de lipídios à medida que o verme ficava mais velho. Através da técnica da prata amoniacal, identificamos forte marcação dos carboidratos ácidos nas regiões tegumentares e subtegumentares do verme, com marcação do glicocálice presente apenas nos vermes com 45 dias. Já com o PTA foi identificada a presença de proteínas básicas no núcleo e nucléolo de células subtegumentares para todos os vermes, além de corpos de inclusão e espículas do tegumento nos vermes com 45 e 130 dias. O esclarecimento da composição bioquímica da região tegumentar e subtegumentar do verme adulto *S. mansoni* fornece dados para um melhor entendimento das relações parasito-hospedeiro.

**Palavras chaves:** Verme adulto. *Schistosoma mansoni*. Citoquímica, Ultraestrutura.

## ABSTRACT

An alternative to identify biochemical components required for the establishment and maintenance of the parasite in the host may be obtained by the cytochemistry. In this work, it was conducted an ultrastructural cytochemical study of the *Schistosoma mansoni* adult male worm with 25, 45 and 130 days after infection. Calcium sites were identified using the Hepler technique. For the recognition of the anionic groups it was employed cationized ferritin and enzymatic treatment with trypsin, chondroitinase and neuraminidase. The technique of imidazole buffer was used to the identification of unsaturated lipids. Phosphotungstic acid (PTA) and ammoniacal silver stains were utilized to find basic proteins. The location of the calcium sites was fairly uniform, demarcating the internal spaces, mainly in the worm muscle tissue regardless of their age. The samples treated with ferritin cationized presented a strong staining in the tegument membrane and the glycocalyx, the intensity of the staining increased according to the worm age. The neuraminidase treatment did not change the staining pattern, whereas trypsin showed a moderate staining on the outer surface. The chondroitinase treatment resulted in few spots on the worm surface. It was observed the presence of unsaturated lipids with globular shape throughout the tegument and the subtegument, with a higher lipid concentration as the worm aged. Through the use of the ammoniacal silver technique it was identified a strong staining of acid carbohydrates in the worm tegument and subtegument, while glycocalyx staining was only present in worms with 45 days old. The PTA identified the presence of basic proteins in the nucleus and nucleolus of subtegumentar cells, beside the inclusion bodies and the spines in worms with 45 and 130 days. The knowledge of the biochemical composition of the *S. mansoni* tegument and subtegument provides data for a better understanding of the parasite biology, as well as the host-parasite relationship.

**Key words:** *Schistosoma mansoni* adult worm, Cytochemistry, Ultrastructure.

## LISTA DE ILUSTRAÇÃO

	Pág.
Figura 1 - Mapa mostrando a distribuição geográfica da esquistossomose no Brasil.	19
Figura 2 - Mapa mostrando a distribuição da Esquistossomose no litoral de Pernambuco e região metropolitana do Recife.....	20
Figura 3 - Imagem ilustrativa mostrando o ciclo biológico do <i>Schistosoma mansoni</i> .....	22
Figura 4 – Eletromicrografia mostrando os vermes adultos macho e fêmea de <i>Schistosoma mansoni</i> .....	25
Figura 5 - Desenho esquemático do tegumento do verme adulto de <i>S. mansoni</i> .....	29
Figura 6(A-F) - Eletromicrografias da morfologia externa e interna do verme macho de <i>S. mansoni</i> .....	60
Figura 7(A-D) - Eletromicrografias de vermes de <i>S. mansoni</i> com 25 dias para localização de sítios de cálcio.....	61
Figura 8(A-F) - Eletromicrografias de vermes de <i>S. mansoni</i> com 45 dias (A, C e E) e 130 dias (B, D e F) para localização de sítios de cálcio.....	62
Figura 9 (A-I) - Eletromicrografias de vermes de <i>S. mansoni</i> com 25 dias (A e B), 45 dias (D e E) e 130 dias (G e H) para identificação de carboidratos ácidos através da ferritina cationizada.....	63
Figura 10(A-F) - Eletromicrografias de vermes de <i>S. mansoni</i> 25 dias para localização de lipídios insaturados através do imidazol.....	64
Figura 11(A-F) - Eletromicrografias de vermes de <i>S. mansoni</i> com 45 dias para localização de lipídios insaturados através do imidazol.....	65
Figura 12(A-E) - Eletromicrografias de vermes de <i>S. mansoni</i> com 130 dias para localização de lipídios insaturados através do imidazol.....	66
Figura 13(A-I) - Eletromicrografias de vermes de <i>S. mansoni</i> – 25 dias (B), 45 dias (C-G) e 130 dias (H e I) para identificação de proteínas básicas, através da prata amoniacal.....	67
Figura 14(A-E) - Eletromicrografias de vermes de <i>S. mansoni</i> – 25 dias (B), 45 dias (C) e 130 dias (D e E) para identificação de proteínas básicas, através do Ácido fosfotungstico.....	68

## SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	17
2.2. EPIDEMIOLOGIA E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA.....	17
2.3. HOSPEDEIROS INTERMEDIÁRIOS.....	20
2.4. CICLO BIOLÓGICO.....	21
2.5. MORFOLOGIA DAS FASES EVOLUTIVAS DO <i>S. mansoni</i> .....	22
2.5.1. Ovo.....	22
2.5.2. Miracídio.....	22
2.5.3. Esporocisto.....	23
2.5.4. Cercária.....	23
2.5.5. Esquistossômulo.....	24
2.5.6. Vermes adultos.....	24
2.5.6.1. Tegumento.....	26
2.5.6.2. Musculatura.....	27
2.5.6.3. Sistema Excretório.....	27
2.5.6.3.1 Células Flame.....	27
2.6. PATOGENIA DA ESQUISTOSSOMOSE.....	27
2.7. QUIMIOTERAPIA ANTIPARASITÁRIA.....	29
2.8. CITOQUÍMICA.....	30
3. OBJETIVOS.....	32
3.1. Geral.....	32
3.2. Específicos.....	32
4. REFERÊNCIAS.....	33
5. ARTIGO - Aspecto ultraestrutural e citoquímico da região tegumentar e subtegumentar do verme adulto macho de <i>Schistosoma mansoni</i> Sambon, 1907.....	42
6. CONCLUSÕES.....	69
ANEXO – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA ANIMAL.....	70

## 1. INTRODUÇÃO

No gênero *Schistosoma*, encontra-se espécies de importância em saúde pública que são agentes etiológicos da esquistossomose humana. A presença desta parasitose é um importante indicativo sócio-econômico e atualmente representa um sério problema de saúde pública, considerada como uma doença parasitária crônica entre as doenças tropicais. Esta helmintíase ocupa, após a malária, a segunda posição no mundo estando presente em 77 países com cerca de 230 milhões de pessoas afetadas pela doença (WHO, 2012). No Brasil, aproximadamente 10 milhões de pessoas estão infectadas pelo *Schistosoma mansoni*, sendo que a maior parte dos casos está na região do nordeste, com aproximadamente 6 a 8 milhões (WHO, 2012; CIDIA *et.al.*, 2011).

Entre os fatores que contribuíram para propagação da esquistossomose estão os movimentos migratórios, a exploração inadequada de recursos hídricos, a distribuição ampla dos hospedeiros intermediários, a longevidade da doença e a falta de educação sanitária (RIBEIRO *et al.*, 2004). Em Pernambuco a esquistossomose é historicamente endêmica na região rural (COUTINHO *et al.*, 1997). A migração de trabalhadores rurais, aliada à gradual ocupação e modificação dos espaços urbanos, têm determinado a contínua expansão da esquistossomose e o estabelecimento de novos focos urbanos em Pernambuco (BARBOSA *et al.*, 1998), Ceará (ALMEIDA *et al.*, 1991), Minas Gerais (BARATA *et al.*, 2000), Sergipe (SILVA *et al.*, 2000) e São Paulo (LIMA, 1995).

As principais manifestações clínicas da esquistossomose estão caracterizadas pelos distúrbios intestinais, hepatomegalia, esplenomegalia e varizes esofagianas. A doença pode evoluir dependendo da intensidade da infecção, e diversos outros fatores podem conduzir ao sangramento gastrointestinal, ascite e anemia (CARMO, 1999; XIMENES, 2000).

No ciclo de vida da esquistossomíase, o hospedeiro intermediário desempenha um papel fundamental na manutenção do parasita. A longevidade de vermes adultos de *S. mansoni* pode ser considerada como dependente de dois fatores, uma adaptação bem-sucedida para as condições ambientais nas

33 veias mesentéricas de hospedeiros definitivos e uma estratégia eficaz para a  
34 evasão do sistema imunológico (TEMPONI *et al.*, 1997).

35 A organização da cutícula do parasito e sua composição bioquímica são  
36 de extrema importância para o entendimento do desenvolvimento do parasito  
37 no hospedeiro devido a sua intrínseca relação com o sistema imune do  
38 hospedeiro (THOMPSON; GEARY, 1995).

39 A caracterização da ultraestrutura da larva infectante do *S. mansoni* tem  
40 sido realizada resultando no acúmulo de informações, porém a maioria desses  
41 trabalhos está concentrada em órgãos e sistema ou em áreas limitadas da  
42 larva tal como o tegumento (CAVALCANTI *et al.*, 2009; DORSEY *et al.*, 2002).

43 A ultraestrutura do verme adulto de *S. mansoni* tem sido abordada  
44 resultando na obtenção de algumas informações, porém, é bastante importante  
45 correlacionar morfologia com composição bioquímica, neste sentido a  
46 citocímica é ainda pouco explorada. Sendo assim, é de grande importância  
47 um estudo citocímico ultraestrutural visando caracterizar os vermes adultos de  
48 *S. mansoni* para um trabalho mais eficiente no combate desta parasitose, o  
49 desenvolvimento de um diagnóstico preciso (PHILIPP *et al.*, 1984), bem como  
50 para um programa de imunização em áreas endêmicas (WHO, 2012).

51 O tegumento do verme *S. mansoni* apresentam estruturas que contêm  
52 mucopolissacarídeos e vesículas multilaminadas ricas em fosfolípidios. Estas  
53 observações estão relacionadas à capacidade do verme para adquirir  
54 glicolípido do hospedeiro (WILSON; BARNER, 1974).

55 Os principais componentes bioquímicos do tegumento do verme macho  
56 de *Schistosoma* são as glicoproteína, fosfolípido e glicolípido. O tegumento  
57 pode ser diferenciado de outros tecidos por apresenta enzimas hidrolíticas  
58 específicas como fosfatase alcalina, esterase de adenosina trifosfatase e  
59 indoxil, e essas podem ser usadas como marcadores para estruturas  
60 intrínsecas do tegumento. As células subtegumentares parecem ser os  
61 principais locais de atividade biossintética uma vez que contêm grandes  
62 quantidades de RNA e enzimas mitocondriais (Wheater; Wilson, 1976).

63 De acordo com Bhardwy e Skelly (2011) a enzima fosfatase alcalina  
64 pode ser encontrada no verme macho e fêmeas do *Schistosoma*, e é altamente

65 expressa na superfície do parasita, músculos e tecidos parenquimatosos. A  
66 fosfatase alcalina tem função tegumentar de gerar a adenosina  
67 imunossupressora para os vermes, permanecer inalterada aos efetores imunes  
68 do hospedeiro, pode ainda melhorar a capacidade térmica do parasita.

69 A composição lipídica dos nematódeos, especialmente parasitas, tem  
70 sido objeto de estudos, principalmente porque este elemento pode  
71 desempenhar um papel importante na interação hospedeiro-patógeno e  
72 mecanismos de escape. Infecções com *S. mansoni* também são um grande  
73 problema devido à falta de uma vacina, os fracassos na tentativa de erradicar o  
74 caramujo e o desenvolvimento de resistência do parasita às drogas  
75 esquistossomicidas (SILVA *et al.*,2002). Assim uma análise citoquímica dos  
76 estágios de vida do *S. mansoni* é de grande importância para que se possa  
77 compreender a base da persistência do parasita no hospedeiro (MAIZELS *et*  
78 *al.*,1985). As técnicas citoquímicas utilizadas para microscopia eletrônica  
79 mostram-se eficientes para o esclarecimento de moléculas presentes nos  
80 parasitos levando um melhor entendimento das relações parasito-hospedeiro.

81

## 82 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 83 2.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

84 A esquistossomose mansônica é uma parasitose humana, causada por  
85 vermes trematódeos, digenéticos, pertencentes ao gênero *Schistosoma*, que  
86 tem como agente etiológico o *S. mansoni* como única espécie presente na  
87 América Latina, cujas formas adultas habitam os vasos mesentéricos do  
88 hospedeiro definitivo enquanto a larva cercarial se desenvolve em caramujos  
89 gastrópodes aquáticos do gênero *Biomphalaria* (WHO, 2012). Este pode estar  
90 presente em coleções aquáticas dulcícolas naturais ou artificiais, perenes ou  
91 intermitentes, preferencialmente com correnteza laminar. Esta doença é  
92 assintomática, podendo evoluir para formas clínicas extremamente graves e  
93 levar o paciente ao óbito (WHO, 2012; MELO; COELHO, 2005).

94 A magnitude de sua prevalência, associada à severidade das formas  
95 clínicas e a sua evolução, conferem a esquistossomose uma grande relevância  
96 como problema de saúde pública (IBIKOUNLÉ *et al.*, 2009).

97

### 98 2.2. EPIDEMIOLOGIA E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

99 Dentre as parasitoses humanas de áreas tropicais e subtropicais, a  
100 esquistossomose é, depois da malária, a mais importante em termo sócio-econômico e  
101 de saúde pública. A esquistossomose é uma doença parasitária endêmica em áreas  
102 tropicais, encontrados em 77 países, situados na África, América do Sul, Caribe,  
103 Oriente Médio e no continente Asiático (WHO, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2008). Estima-  
104 se que 800 milhões vivem em áreas endêmicas expostas à infecção. Além disso,  
105 cerca 20 milhões de pessoas morrem por consequência da doença associada  
106 esquistossomose, como o câncer de bexiga (esquistossomose urinária) e a cirrose. A  
107 doença causa um enorme problema de saúde pública porque afeta um grande número  
108 de crianças e jovens em fase de vida produtiva e é responsável por mais de 500 mil  
109 mortes por ano (WHO, 2012, RAGHAVAN *et al.*, 2003).

110 Apesar da distribuição da helmintíase ter modificado nas últimas  
111 décadas, o número de pessoas infectadas ou com risco de serem infectados  
112 não diminuiu e continua a se espalhar para outras regiões geográficas (ROSS  
113 *et al.*, 2002; CHITSULO *et al.*, 2000), assim como a disseminação da doença  
114 da área rural para urbana (ANDRADE, 1998). As principais causas de óbitos  
115 estão relacionadas às formas clínicas graves. O crescimento e a migração

116 populacional associado à facilitação e velocidade dos meios de transporte  
117 aumentaram a chance da exposição ao parasito permitindo a disseminação da  
118 infecção a níveis internacionais (MAKINSON *et al.*, 2008).

119 No Brasil, a esquistossomose foi descrita pela primeira vez por Pirajá da  
120 Silva em 1908 e ainda é considerado um problema de saúde pública devido à  
121 extensão da área de transmissão. O número de portadores, casos graves  
122 (hepatosplenicos, neuroesquistossomose, forma aguda, abscesso hepático,  
123 glomerulonefrite, entre outros) e de mortes causadas pela doença representam  
124 um fardo para a economia dos países em desenvolvimento (LAMBERTUCCI *et al.*,  
125 2007, 2001, 2000).

126 No Brasil, estima-se que cerca de 10 a 12 milhões de pessoas  
127 infectadas e 25 milhões expostas ao risco. De acordo com dados do Ministério  
128 da Saúde (BRASIL, 2010), doença parasitária que atinge cerca de 2,5 milhões  
129 de brasileiros em 19 estados, com maior prevalência nas regiões do Nordeste e  
130 Sudeste. Sendo os estados de Minas Gerais e Bahia os que apresentam maior  
131 incidência (REY, 2008, CARVALHO; COELHO; LENZI, 2008, FERRARI, 2003)  
132 (Fig. 1).

133

134 Figura 1: Mapa mostrando a distribuição geográfica da esquistossomose no  
135 Brasil.

136

137

138

139

140

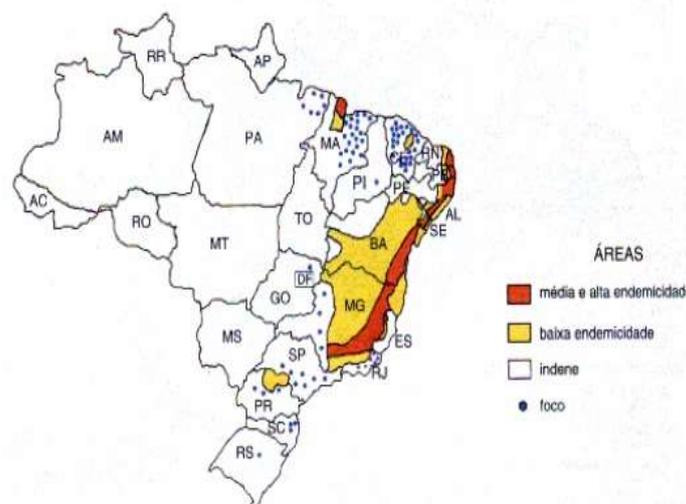
141

142

143

144

145



146

147

No Nordeste, nos Estados de Pernambuco e Alagoas esta doença é a  
terceira causa de morte entre as doenças classificadas como grandes

148 endemias rurais (KATZ; PEIXOTO, 2000). No estado de Pernambuco, a área  
 149 endêmica para esquistossomose abrange 79 dos 167 municípios (47%), dos  
 150 quais 55 (73,3%) estão na zona do Litoral e na zona da Mata e 24 (30,4%), no  
 151 agreste. Segundo o censo demográfico de 2004, 4.938.861 pessoas residem  
 152 em municípios de área endêmica, o que permite estimar que 62% da  
 153 população de Pernambuco (7.911.937 pessoas) estejam sob-risco de infecção  
 154 (REY, 2008) (Fig. 2).

155

156 FIGURA 2: Mapa mostrando a distribuição da Esquistossomose no litoral de  
 157 Pernambuco e região metropolitana do Recife.  
 158

159

160

161

162

163

164

165

166

167

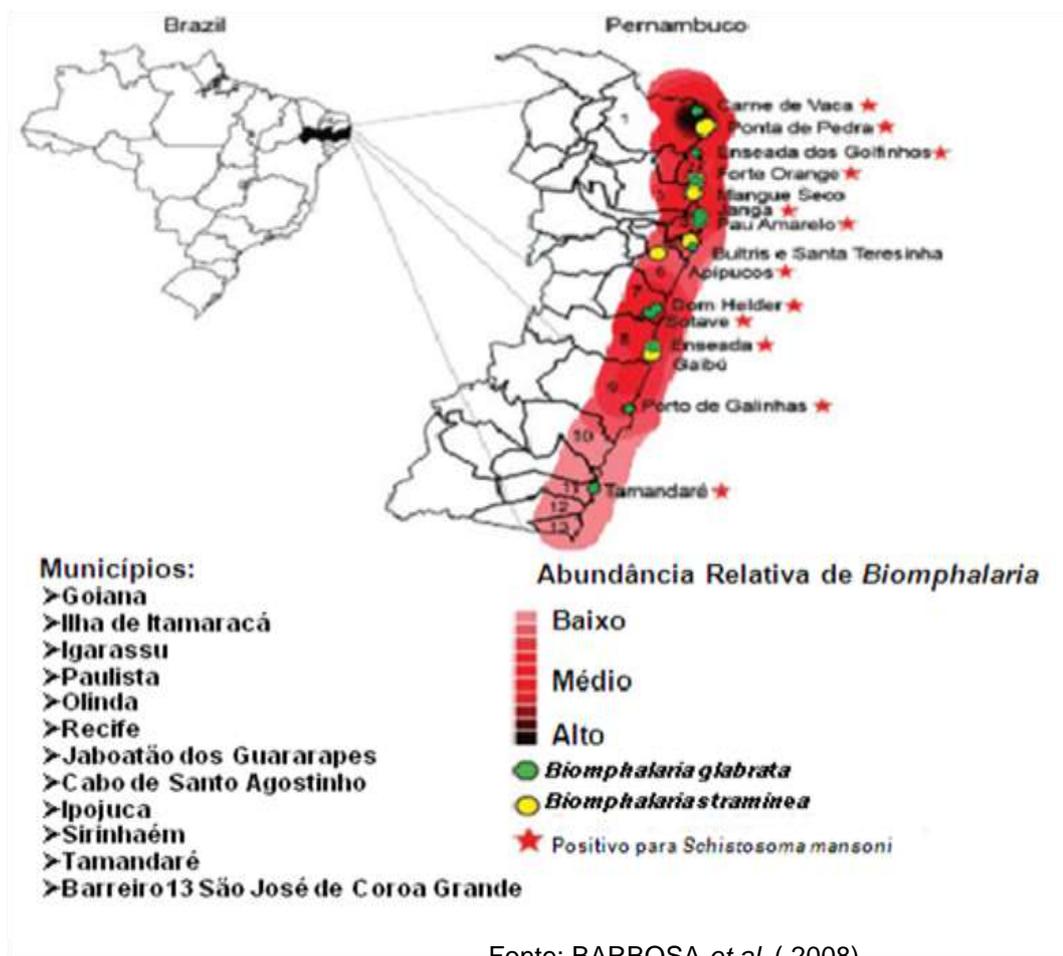
168

169

170

171

172



### 173 2.3. HOSPEDEIROS INTERMEDIÁRIOS

174 O hospedeiro intermediário (caramujo) é fundamental na manutenção da  
175 parasitose (SCHNEIDER; ZELCK, 2001). Atualmente três espécies de  
176 moluscos planorbídeos transmitem, em condições naturais, o *S. mansoni* em  
177 nosso meio: *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria tenagophila* e *Biomphalaria*  
178 *straminea*. Sendo a *B. glabrata* a mais suscetível dos hospedeiros  
179 intermediários no Brasil devido à sua distribuição, grande sensibilidade à  
180 infecção e eficiência na transmissão da esquistossomose em relação às outras  
181 espécies (MARCHIORI, 1999). A *B. straminea* apresenta uma alta resistência à  
182 infecção pelo *S. mansoni*, apesar de encontrar-se presente praticamente, em  
183 todas as bacias hidrográficas do território brasileiro, por melhor se adaptar às  
184 variações climáticas. Já a *B. tenagophila* possui distribuição ao longo da costa,  
185 desde o estado da Bahia até o Rio Grande do Sul, sendo detectada em menor  
186 extensão em outros Estados (FUNASA, 2002).

187

### 188 2.4. CICLO BIOLÓGICO

189 O ciclo biológico do *S. mansoni* é do tipo heteróximo, sendo formado por  
190 duas fases parasitárias: uma no hospedeiro definitivo em sua fase adulta,  
191 vivendo na corrente sanguínea do hospedeiro (vertebrado/homem) e outra no  
192 hospedeiro intermediário (invertebrado/caramujo), o molusco do gênero *B.*  
193 *glabrata* (BRASIL, 2005) (Fig. 3).

194 A transmissão da doença inicia-se quando fezes humanas contendo  
195 ovos de *S. mansoni* contaminam bacias hídricas (rios, córregos, lagoas e  
196 açudes). Condições adequadas de temperatura e luz permitem que os ovos  
197 eclodam e liberem os miracídeos, que são larvas ciliadas que penetram no  
198 hospedeiro intermediário e sofrem transformações no seu interior, originando os  
199 esporocistos primários e esporocistos secundários, dando origem ao seu último  
200 estágio, a cercária no interior do molusco. Estas rompem os tecidos dos  
201 moluscos e se dispersam no ambiente aquático e, ao entrarem em contato com  
202 o hospedeiro definitivo, penetram na sua pele e ou mucosa iniciando assim o  
203 processo infeccioso humano (BARBOSA *et al.*, 2008; BRASIL, 2005). Ao  
204 penetrar na pele do homem se transformam em uma forma parasitária

205 denominada esquistossômulo, que para evitar as reações celulares, invadem  
206 os vasos venosos e/ou linfáticos, passando a migrar em direção ao coração.

207 O ciclo se completa, em condições favoráveis, em torno de 80 dias. O  
208 indivíduo parasitado abriga os vermes adultos nos vasos sanguíneos do  
209 sistema porta-hepático, onde se acasalam, e a partir daí migram para as  
210 vênulas do plexo hemorroidário, onde as fêmeas põem ovos. Uma fêmea  
211 coloca 300 ovos por dia, que se desenvolvem uma semana depois, quando  
212 então passam para a luz intestinal e são eliminados nas fezes (KATZ;  
213 ALMEIDA, 2003).

214

215 Figura 3: Imagem ilustrativa mostrando o ciclo biológico do *Schistosoma*  
216 *mansoni*.

217

218

219

220

221

222

223

224

225

226

227

228

229

230

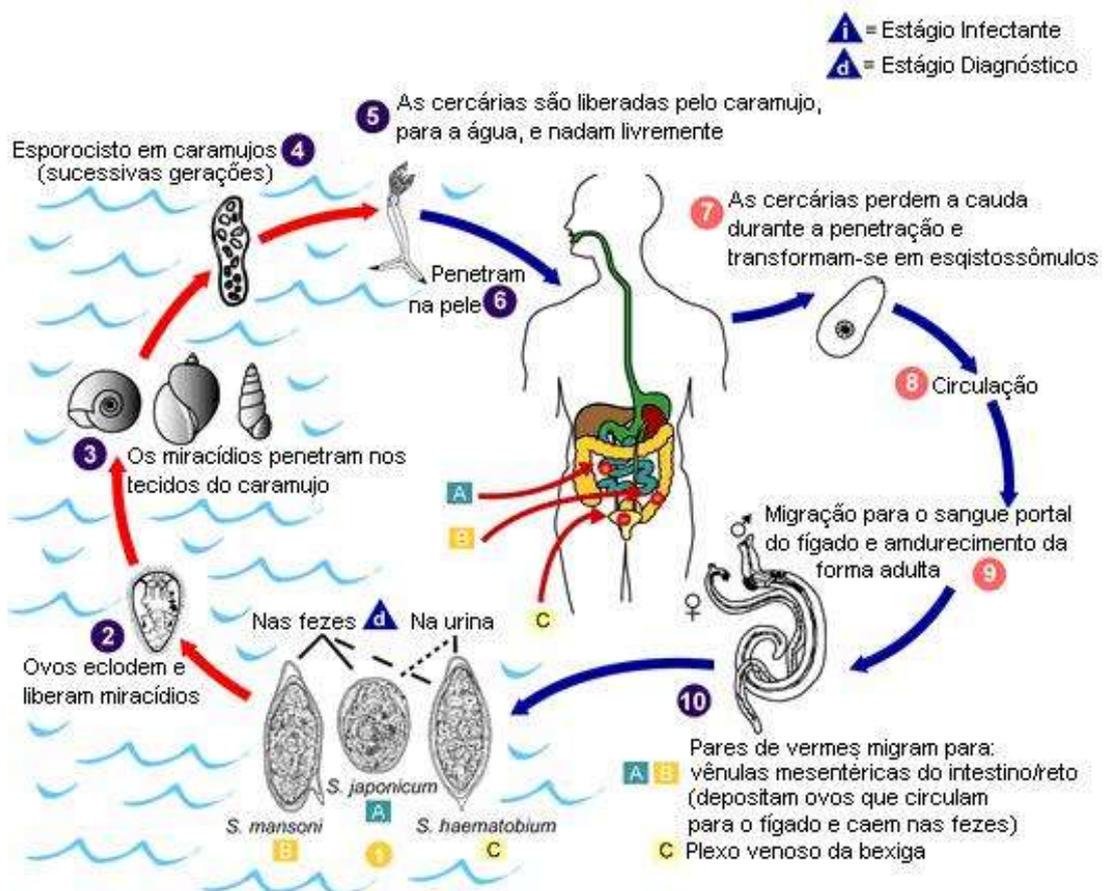
231

232

233

234

235



Fonte: WHO, 2012

## 236 **2.5. MORFOLOGIA DAS FASES EVOLUTIVAS DO *S. mansoni***

### 237 **2.5.1. Ovo**

238 Os ovos medem de 110 a 180 µm de comprimento por 45 a 70 µm de  
239 largura. Apresenta um pólo anterior mais delgado e o posterior mais volumoso,  
240 com um espinho lateral saliente e agudo (REY, 2008). Apresenta uma  
241 resistente casca dupla, a mais interna envolve o embrião (miracídio).

242

### 243 **2.5.2. Miracídio**

244 Os miracídios medem cerca de 160 por 60 µm e estão revestidos por  
245 pequeno número de células epiteliais pavimentosas providas de numerosos  
246 cílios (REY, 2008). A organização estrutural do miracídio esta dividida em: a)  
247 sistema epitelial b) terebratório c) musculatura d) células intersticiais e)  
248 glândulas de penetração f) sistema excretório g) sistema nervoso h) células  
249 germinativas. Na extremidade anterior do miracídio, abre-se um par de  
250 glândulas adesivas e uma glândula de penetração, todas unicelulares contendo  
251 no seu interior um material supostamente enzimático (PAN, 1980).

252

### 253 **2.5.3. Esporocisto**

254 Ao penetrar no interior do molusco, o miracídio perde seu revestimento  
255 epitelial ciliado, permanece nas proximidades do ponto de penetração e se  
256 transforma em uma estrutura sacular alongada. No oitavo dia a larva se  
257 apresenta com um tubo enovelado, imóvel e cheio de células germinativas em  
258 multiplicação e passa a ser denominado de esporocisto primário. No seu  
259 interior, as células germinativas vão se transformar em esporocistos de  
260 segunda geração, com a mesma arquitetura e por volta da segunda semana de  
261 existência mede 1,5 mm ele se rompe para liberar entre 20 e 40 esporocistos  
262 filhos. Os esporocistos secundários migram para o hepatopâncreas e o  
263 ovotésteis do molusco, onde continuam a crescer. Quando maduros, exibem na  
264 extremidade anterior uma protuberância móvel e um poro para eliminação de  
265 cercárias. O tempo necessário para a maturação dos esporos filhos e formação  
266 das primeiras cercárias é de 3 a 4 semanas, variando com a temperatura  
267 ambiente (REY, 2008). De acordo com alguns trabalhos, depois de terem  
268 produzido cercárias por certo tempo, os esporocistos secundários podem voltar

269 a formar uma terceira geração de esporocistos capaz de retomar a produção  
270 de nova geração de cercárias (NEVES, 2005).

271

#### 272 **2.5.4. Cercária**

273 A cercária mede cerca de 500µm, Figura 5 (DORSEY *et al.*, 2002).  
274 Estruturalmente, a cercária de *S. mansoni*, apresenta-se dividida em: órgão  
275 anterior ou ventosa oral, segmento do corpo (com cutícula recoberta de  
276 espinhos) e cauda medindo cerca de 300 µm, terminando em uma bifurcação,  
277 (NEVES, 2005; DORSEY *et al.*, 2002).

278

#### 279 **2.5.5. Esquistossômulo**

280 Logo quando a cercária penetra no hospedeiro definitivo, ocorrem  
281 algumas alterações estruturais, esta adaptação está relacionada à mudança do  
282 ambiente. Além da perda da cauda o trematóide forma rapidamente uma  
283 camada de microvilosidade sobre todo o tegumento, modifica a respiração  
284 (passando da forma aeróbica para anaeróbica), desenvolve uma sensibilidade  
285 à água e uma resistência ao sistema complemento, modifica ou altera o  
286 glicocálice e modifica a membrana trilaminar para a heptalaminar  
287 (STIREWALT, 1974). Toda essa adaptação estrutural dá origem a um outro  
288 estágio larval chamado de esquistossômulo. Os esquistossômulos  
289 permanecem nos tecidos da derme por dois a três dias, ao fim dos quais se  
290 não forem destruídos pelo sistema imune do hospedeiro, acabam penetrando  
291 em um vaso cutâneo e é passivamente arrastado pela circulação em direção  
292 ao coração e pulmões. Após uma semana eles se localizam no sistema porta  
293 intra-hepático, onde pela primeira vez apresentam pigmento hemático no  
294 intestino, onde crescem e amadurecem até o final da quarta semana (REY,  
295 2008).

296

#### 297 **2.5.6. Vermes adultos**

298 Diferentes da maioria dos trematódeos apresentam-se como vermes  
299 dióicos, tendo ambas as formas macho e fêmea e morfologicamente são  
300 delgados e longos (NEVES *et al.*, 2005) (Fig. 4). O macho de *S. mansoni* mede  
301 cerca de 1,0 cm de comprimento e apresentam coloração branca. Na  
302 extremidade anterior traz uma ventosa oral afilada, e a pequena distância

303 desta, uma segunda ventosa, o acetábulo. O curto segmento anterior  
304 compreendido entre as duas ventosas é cilíndrico e mais fino que o segmento  
305 posterior. Este é muito mais longo achatado dorsoventralmente, porém  
306 enrolado de maneira a formar uma calha ou tubo longitudinal conhecido como  
307 canal ginecóforo, (REY, 2008).

308 A fêmea tem corpo cilíndrico, mais longo e mais fino que a do macho  
309 (1,2 a 1,6 cm de comprimento). Apresenta uma coloração escura e acinzentada  
310 devido à presença, no tubo digestivo, de um pigmento derivado da digestão do  
311 sangue (hemozoína). Possui duas ventosas pequenas, estando a ventosa  
312 acetabular, pedunculada, muito perto da oral (REY, 2008). Como nos demais  
313 trematódeos, o revestimento externo dos vermes adultos é formado por uma  
314 citomembrana espessa que recobre o tegumento. Este é constituído por uma  
315 camada sincicial anucleada, mas que liga por pontes citoplasmáticas a células  
316 nucleadas, situadas mais profundamente (NEVES *et al.*, 2005).

317 A superfície do tegumento exibe grande quantidade de pequenos  
318 tubérculos, mas abundantes na superfície dorsal. Estruturas mais delicada  
319 podem ser observadas com grande aumento, consistindo de minúsculos  
320 espinhos situados principalmente na superfície interna das ventosas assim  
321 como nos botões sensoriais (NEVES *et al.*, 2005). Logo abaixo do tegumento  
322 estão as camadas musculares da parede do corpo do helminto, responsáveis  
323 pela movimentação. Todo espaço interior entre os órgãos internos, é ocupado  
324 por um tecido de sustentação denominado estroma, formado de células  
325 estreladas e lacunas cheias de um líquido intersticial (REY, 2008).

326 Figura 4 – Eletromicrografia mostrando os vermes adultos macho e fêmea de  
327 *Schistosoma mansoni*.

328  
329  
330  
331  
332  
333  
334  
335  
336



Fonte: FABIO BRAYNER

337 **2.5.6.1. TEGUMENTO**

338 O tegumento é uma estrutura única formada por componentes utilizados  
339 pelo *S. mansoni* para sobreviver dentro de seu hospedeiro (HELLEMOND *et al.*,  
340 2006). A estrutura básica do tegumento é constituída por glicocálice,  
341 membrana tegumentar, espinhos ou espículas, corpos membranosos, bolsas  
342 tegumentares, mitocôndrias e corpos de inclusão (HOCKLEY, 1973) (Fig. 5).  
343 Algumas dessas executam uma variedade de funções fisiológicas importantes,  
344 incluindo canais transmembrana de íons, atividades enzimáticas e receptoras  
345 para moléculas que visam a modulação da repostas do hospedeiro e  
346 sobrevivência do parasita (CESARI *et al.*, 2010; HELLEMOND *et al.*, 2006).  
347 Juntamente com o projeto genoma do *S. mansoni* as recentes técnicas  
348 desenvolvidas (proteômicas e lipidômicas) permitem caracterizar as proteínas e  
349 lipídios das membranas tegumentares. Estes estudos não só identificam como  
350 também confirmam a função do tegumento, estudada antes com técnicas  
351 bioquímicas clássicas usadas para identifica proteínas e a composição  
352 molecular. De acordo com Araújo *et al.*, (1993) estas estruturas estão  
353 envolvidas na obtenção de nutrientes, no processo de evasão do sistema  
354 imune e apresentam importantes antígenos que elicitam a resposta  
355 imunológica.

356 Figura 5 - Desenho esquemático do tegumento do verme adulto de *S. mansoni*.



368 Fonte: Adaptado de HOCKLEY, 1973. cm=corpo membranosos, ci=corpo de inclusão, B=bolsa tegumentar,  
369 mc=músculo circular, ml=músculo longitudinal, R=retículo endoplasmático, G= golgi, N=núcleo,  
370 M=mitocôndria, V=vacúolo.

371 **2.5.6.2. MUSCULATURA**

372 A musculatura do *S. mansoni* envolve os músculos circulares externos,  
373 uma ou mais camadas subjacentes de músculo longitudinais fibrosos,  
374 músculos fibrosos mais profundos orientados diagonalmente, musculatura  
375 cônica e oral da ventosa, músculos presentes ao redor de órgãos internos  
376 (como o trato digestivo e glândulas) e pequenas e discretas células musculares  
377 presentes no parênquima (STIREWALT; DORSEY, 1973).

378

379 **2.5.6.3. SISTEMA EXCRETÓRIO**

380 Este sistema compreende as células flame periféricas, túbulos coletores  
381 primários e secundários, um par de tubos coletores principal no corpo e um  
382 tubo simples, bexiga excretória, átrio e poros excretórios (MEULEMAN, 1972).

383

384 **2.5.6.3. 1. Células Flame**

385 As células flame apresentam características únicas e ultraestruturais,  
386 tem o corpo das células nucleadas, com um “cup-shaped” de projeção, com  
387 flagelos que cobre a superfície interna do corpo, que incluem uma estrutura  
388 referida como um "barril oco” que rodeia numerosos axonemas que  
389 compreendem o batimento destes flagelos se assemelha a uma bandeira  
390 (SCHMIDT; ROBERT, 2000). A célula flame periférica são considerados  
391 elementos protonefrídio envolvidos no processo de excreção e osmorregulação  
392 em diferentes fases do *S. mansoni* e também pode ser encontrado em outros  
393 trematódeos (RUPPERT; FOX; BARNES, 2004; PINHEIRO *et al.*, 2005).

394

395 **2.6. PATOGENIA DA ESQUISTOSSOMOSE**

396 A patogenia está ligada a vários fatores, como: a cepa do parasito, carga  
397 parasitária adquirida, idade do paciente, estado nutricional do paciente,  
398 resposta imunitária, frequência e duração das infecções, sendo a carga  
399 parasitária e o sistema imune do paciente os mais importantes. A  
400 sintomatologia clínica corresponde ao estágio de desenvolvimento do parasito  
401 no hospedeiro (BRANDT *et.al.*, 2007; MELO; COELHO, 2005).

402 O homem, na fase inicial da doença, pode apresentar dermatite  
403 cercariana, causada pela penetração das cercárias. É caracterizada por  
404 “sensação de comichão” e erupção urticariforme, sendo seguida depois de 24  
405 horas de edema, pequenas papilas e dor. Trata-se de um processo inflamatório  
406 importante, já que é a primeira forma de combate do hospedeiro ao parasito,  
407 com grande destruição de cercarias e esquistossômulos no momento do  
408 processo de migração destes pela corrente sangüínea até o sistema porta  
409 intra-hepático (MELO; COELHO, 2005). A forma aguda da parasitose parece  
410 em torno de 50 dias e dura até cerca de 120 dias após a infecção. A forma  
411 toxêmica pode ocorrer por disseminação dos ovos principalmente na parede do  
412 intestino, com áreas de necrose (levando a uma enterocolite aguda), e no  
413 fígado, provocando a formação de granulomas, os sintomas podem ser  
414 caracterizados por urticária e edema localizados, diarreia muco-sanguinolento,  
415 febre elevada, anorexia, náusea, vômito, hepatoesplenogalia dolorosa,  
416 manifestações pulmonares e astenia. (PORDEUS *et.al.*, 2008). A fase aguda  
417 desaparece através de tratamento específico ou evolui (se não tratada) para a  
418 fase crônica, esta fase inicia-se após seis meses da infecção e pode evoluir por  
419 vários anos, as manifestações clínicas variam, dependendo da localização,  
420 intensidade do parasitismo e da imunidade do indivíduo (MELO; COELHO,  
421 2005). Estando dividida em dois estágios principais: forma intestinal ou hepato-  
422 intestinal e, a mais grave, forma hepatoesplênica, representada pelo  
423 crescimento e endurecimento do fígado e do baço (PORDEUS *et.al.*, 2008).

424 Todavia, ovos e vermes adultos do parasito podem ser encontrados em  
425 qualquer órgão ou tecido do corpo humano como pulmões, cérebro, testículos,  
426 ovários, entre outros (PRATA, 2006; MELO; COELHO, 2005; KATZ; ALMEIDA,  
427 2003;). Segundo SILVA *et al.* (2004) a mielorradiculopatia esquistossomótica  
428 (ME) é a forma ectópica mais grave e incapacitante da infecção causada pelo  
429 *S. mansoni*, porem o Sistema Nervoso Central (SNC) pode ser acometido por  
430 outras duas espécies, o *S. haematobium* e o *S. japonicum*. Nas formas  
431 sintomáticas, as duas primeiras espécies citadas se apresentam com síndrome  
432 mielorradicular e última com envolvimento, cerebral. A patogenia da ME  
433 permanece desconhecida apesar de se ter conhecimento sobre a existência da  
434 reação inflamatória do hospedeiro causada pela presença dos ovos do parasito  
435 no tecido nervoso, o que constitui as principais lesões causadas por esse

436 agente no SNC. De acordo com o mesmo autor a reação inflamatória pode ter  
437 grau variável produzindo cinco principais formas de lesão de acordo com os  
438 aspectos anatômicos e manifestações clínicas, são elas: perda de força, dores  
439 radiculares, déficit sensitivo, distúrbio esfíncteriano e alterações de reflexo. O  
440 diagnóstico se baseia em evidências clínicas de lesão neurológica torácica  
441 baixa ou lombar alta; demonstração da exposição ao agente etiológico por  
442 meios laboratoriais (imunológicos e parasitológicos); e ainda pela exclusão de  
443 outras causas de mielite transversa. O tratamento pode ser realizado com  
444 esquistomicidas, corticoides e/ou cirurgia.

445

## 446 **2.7. QUIMIOTERAPIA ANTIPARASITÁRIA**

447 O progresso da quimioterapia começou nos anos 60, com a introdução  
448 do niridazol, hancantona, oxamniquina e metrifonato. Este período culminou nos  
449 anos 70 com a descoberta do amoscanato, oltipraz e o mais importante,  
450 praziquantel. Desde então, nenhum outro avanço terapêutico foi alcançado  
451 (PARISE FILHO; SILVEIRA, 2001). Destas, existem drogas sintéticas que  
452 afetam o metabolismo de carboidratos e/ou energético (tartarato de potássio e  
453 antimônio) do parasito, outras que interferem no metabolismo do DNA  
454 (Oxamniquine), compostos que alteram a integridade e função da membrana  
455 do parasito (Praziquantel) e ainda princípios ativos que interferem com a  
456 neurotransmissão (Metrifonate) (HARDER, 2002).

457 Pela inexistência de vacinas e de ações eficazes em saúde pública, a  
458 quimioterapia representa o único recurso imediato para minimizar a  
459 prevalência e incidência da esquistossomose no mundo (CIOLI; PICA-  
460 MATTOCCIA; ARCHER, 1995). As drogas recomendadas pela Organização  
461 Mundial de Saúde são a oxamniquina (OXA) e o praziquantel (PZQ) (WHO,  
462 2012). A OXA apresenta excelente eficácia esquistossomicida, mas não  
463 apresenta atividade contra todas as espécies de *Schistosoma* e tem custo  
464 elevado (FOSTER, 1987). O PZQ é a droga de primeira escolha, por ser  
465 efetivo contra todas as espécies de *Schistosoma* que infectam o homem,  
466 apresentar alta atividade antiparasitária, baixa toxicidade, nenhum risco  
467 genotóxico e baixo custo. É uma droga de amplo espectro de ação, com boa  
468 resposta terapêutica contra cestódeos, trematódeos e nematódeos  
469 (ANDREWS *et al.*, 1980).

470 Os mecanismos moleculares de ação do PZQ não são bem conhecidos  
471 (CIOLI, 2004). Entretanto, alguns estudos têm demonstrado que drogas  
472 esquistossomicidas causam extensas alterações tegumentares nos vermes  
473 (FALLON *et al.*, 1996; LIMA *et al.*, 1994). O artemether causa danos graves  
474 no tegumento das formas adulta e juvenil de *S. mansoni* (XIAO *et al.*, 2000;  
475 XIAO *et al.*, 2001). O ácido araquidônico apresenta ação esquistossomicida  
476 contra *S. mansoni* e *S. haematobium* (EL RIDI *et al.*, 2010). A mefloquina que  
477 é uma droga usada para o tratamento da malária, tem demonstrado atividade  
478 *in vivo* contra vermes adultos de *S. mansoni* e *S. japonicum* (ZHANG *et al.*,  
479 2009). Recentemente, o uso da miltefosina, droga usada no tratamento da  
480 leishmaniose, vem sendo usado no tratamento da Esquistossomose africana  
481 (EISSA *et al.*, 2011). Assim estas drogas são de vital importância não somente  
482 para o tratamento de infecções parasitárias e controle da morbidade, como  
483 também no controle da transmissão. A utilização da quimioterapia no controle  
484 da esquistossomose, apesar dos elevados índices de reinfecção em áreas  
485 endêmicas, é ainda uma medida eficiente (SAVIOLI *et al.*, 2004).

486

## 487 **2.8. CITOQUÍMICA**

488 Através da citoquímica é possível conhecer os componentes  
489 bioquímicos presentes em um determinado sistema biológico, onde a sua  
490 identificação, precisa localização, e quantificação, nos leva a um melhor  
491 entendimento dos mecanismos e funções desses compostos.

492 Souza (2005) utilizando a citoquímica em alguns organismos relata que  
493 as proteínas, além de constituírem os principais elementos estruturais e agirem  
494 como enzimas, encontram-se associadas a outros elementos importantes como  
495 lipídios, carboidratos e ácidos nucleicos.

496 Uma das formas de avaliar a natureza protéica da superfície dos  
497 parasitas tem sido a utilização de partículas ligantes carregadas positivamente  
498 como a ferritina cationizada (SOUZA *et al.*, 1989; SOUZA, 2005). As fases de  
499 desenvolvimento de alguns helmintos parasitas são acompanhadas por  
500 mudanças na sua superfície (PROUDFOOT *et al.*, 1993a, 1993b), a alguns  
501 autores sugerem que essas mudanças talvez sejam um sinal do  
502 desenvolvimento ou uma adaptação dos helmintos para invadir o tecido do

503 hospedeiro (AKHKHA *et al.*, 2004). De acordo com Murrell *et al.* (1983), a  
504 presença de grupamentos aniônicos na superfície de helmintos como os  
505 nematóides, possivelmente se relaciona com a proteção contra dessecação.  
506 Além disso, esses grupamentos carregados negativamente poderiam ativar o  
507 complemento via fator de Hageman ou fator XII da coagulação,  
508 desencadeando reações inflamatórias.

509 Algumas proteínas básicas desempenham funções importantes, como  
510 por exemplo, as histonas que desempenham funções celulares tais como a  
511 diferenciação celular e a regulação da função gênica em células eucarióticas.  
512 Para a detecção dessas proteínas a nível ultraestrutural são utilizadas duas  
513 técnicas citoquímica, a do ácido fosfotúngstico (PTA) e o da prata amoniacal.  
514 Estas técnicas apresentam especificidades diferentes, enquanto o PTA revela  
515 proteínas ricas em histidinas, a prata amoniacal identifica proteínas ricas em  
516 arginina e lisina (SOUZA, 2005).

517 A citoquímica para a identificação de lipídios insaturados foi realizada  
518 por Cavalcanti *et al.* (2009) utilizando o tampão imidazol em cercaria de *S.*  
519 *mansoni*. Os autores observaram uma forte marcação das inclusões lipídicas  
520 ricas em ácidos graxos e fosfolipídios. Quando se tem por objetivo localizar  
521 sítios celulares que contenham cálcio pode-se utilizar a técnica do  
522 piroantimoniato de potássio. Os íons de cálcio que desempenham papel  
523 relevante nas atividades celulares foram como associadas a uma série de  
524 funções como contração muscular, o movimento de cílios e flagelos,  
525 fenômenos de despolarização e secreção, ativação de microtúbulos e  
526 microfilamentos, endocitose e exocitose (SPICER *et al.* 1968; OSCHMAN;  
527 WALL, 1972; HEPLER, 1980).

528

529 **3. OBJETIVOS**

530

531 **3.1. Geral**

532 Avaliar ultraestruturalmente componentes bioquímicos da região  
533 tegumentar e subtegumentar dos vermes adultos machos de *S. mansoni*.

534

535 **3.2. Específicos**

536

537 - Caracterizar ultraestruturalmente:

538

539 a) Sítios de afinidade por cálcio nas regiões tegumentar e subtegumentar;

540

541 b) A presença de carboidratos ácidos na superfície do tegumento;

542

543 c) Distribuição de lipídios insaturados;

544

545 d) Localizar as proteínas básicas

546

547 **REFERÊNCIAS**

548

549 AKHKHA *et al.* The potential signalling pathways which regulate surface  
550 changes induced by phytohormones in the potato cyst nematode (*Globodera*  
551 *rostochiensis*). **Parasitology**, v.128, p.533-539, 2004.

552

553 ALMEIDA *et al.* Movimentos migratórios e a expansão da esquistossomose no  
554 Estado do Ceará. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v.33, p.725-728, 1991.

555

556 ANDRADE, Z.A. The situation of hepatosplenic schistosomiasis in Brazil today.  
557 **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.93, p.313-6, 1998.

558

559 ANDREWS, P.; DYCKA, J.; FRANCK, G. Effect of praziquantel on clinical –  
560 chemical parameters in healthy and schistosome-infected mice. **Ann. Trop.**  
561 **Med. Parasitol.**, v.74, p.167-177, 1980.

562

563 ARAUJO, A.C.; SOUTO-PADRON, T.; DE SOUZA, W. Cytochemical  
564 localization of carbohydrate residues in microfilariae of *Wuchereria bancrofti*  
565 and *Brugia malayi*. **J. Histochem. Cytochem.**, v.41, p.571–578, 1993.

566

567 BARATA *et al.* Novo foco de esquistossomose mansoni em sacramento, Alto  
568 do Parnaíba, Minas Gerais, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.33, p.379,  
569 2000.

570

571 BARBOSA *et al.* Epidemiologia e controle da esquistossomose mansoni. In:  
572 CARVALHO, O.S; COELHO; P.M.Z; LENZI, H.L. *Schistosoma mansoni* e  
573 Esquistossomose: **uma visão multidisciplinar**. 20<sup>a</sup> ed. cap.31, Rio de Janeiro:  
574 FIOCRUZ, 2008.

575

576 BARBOSA *et al.* Urban schistosomiasis in Itamaracá Island, Pernambuco,  
577 Brazil: Epidemiological factors involved in the recent endemic process. **Mem.**  
578 **Inst. Oswaldo Cruz**, v.93, p.265-266, 1998.

579

580 BHARDWAJ, R.; SKELLY, P.J. Characterization of schistome alkaline  
581 phosphatase (SmAP). **Plos Negl. Trop. Dis.**, v.5, p.1011, 2011.

582

583 BRANDT *et.al.* Nitric oxide monocyte production levels in patients with the  
584 hepatosplenic form of *Scistosoma mansoni* infection who underwent  
585 splenectomy, ligation of the left gastric vein and auto implantation of spleen  
586 tissue in the major omentum. **Acta Cir. Bras.**, v.34, p.25-30, 2007.

587

588 BRASIL Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de**  
589 **Vigilância Epidemiológica**. 6ª ed. Brasília, DF, 2005.

590

591 BRASIL Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de**  
592 **Vigilância Epidemiológica**. 6ª ed. Brasília, DF, 2010.

593

594 CARMO, E.H. Morbidade e mortalidade por esquistossomose mansônica na  
595 Região Nordeste do Brasil [**Tese de Doutorado**]. Salvador: Instituto de Saúde  
596 Coletiva, Universidade Federal da Bahia; 1999.

597

598 CAVALCANTI *et al.* Ultrastructural and cytochemical aspects of *Schistosoma*  
599 *mansoni* cercaria. **Micron**. v.40, p.394-400, 2009.

600

601 CARVALHO, O.S.; COELHO, P.M.Z.; LENZI, H.L. *Schistosoma mansoni* e  
602 esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: **Ed. FIOCRUZ**;  
603 1123p. 2008.

604

605 CESARI *et al.* Immunoblot analysis of membrane antigens of *Schistosoma*  
606 *mansoni*, *Schistosoma intercalatum*, and *Schistosoma haematobium* against  
607 *Schistosoma* infected patient sera. **Parasitol. Res.**, v.106, p.1225–123, 2010.

608

609 CHITSULO, L.; ENGELS, D.; MONTRESOR, A. The global status of  
610 schistosomiasis and its control. **Acta Trop.**, v.77, p.41-51, 2000.

611

612 CIDIA *et al.* Publicação Científica do Curso de Bacharelado em Enfermagem do  
613 Centro de Ensino Unificado de Teresina – CEUT. Ano 2011. Edição 36.

614 **Observatório Epidemiológico**, 5<sup>a</sup> Semana Epidemiológica. Fonte:  
615 www.jornaldaciencia.org.br em 04 de fevereiro de 2011.  
616

617 CIOLI, D. Determination of ED50 values for praziquantel in praziquantel  
618 resistant and susceptible *Schistosoma mansoni* isolates. **Int. J. Parasitol.**, v.34,  
619 p.979-87, 2004.  
620

621 CIOLI, D.; PICA-MATTOCCIA L.; ARCHER, S. Antischistosomal drugs: past,  
622 present and future? **Pharmac & Ther.** v.68, p.35-85, 1995  
623

624 COUTINHO *et al.* Factors involved in *S. mansoni* infection in rural areas in  
625 Northeast Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.92, p.707-715, 1997.  
626

627 DE SOUZA, W. Microscopy and cytochemistry of the biogenesis of the  
628 parasitophorous vacuole. **Histochem. J.** v.123, p.1-18, 2005.  
629

630 DE SOUZA *et al.* Fine structure and localizations of anionic sites on the surface  
631 of microfilaria of *Wuchereria bancrofti*. **J. of Submicrosc. Cytol. and Pathol.**,  
632 v.21, p.121-129, 1989.  
633

634 DORSEY *et al.* Ultrastructure of the *Schistosoma mansoni* cercaria. **Micron**, v.  
635 33, p.279-323, 2002.  
636

637 EISSA *et al.* Miltefosine, a promising novel agent for *schistosomiasis mansoni*.  
638 **Int. J. Parasitol.**, v.41, p.235-242, 2011.  
639

640 EL RIDI *et al.* In vitro and in vivo activities of arachidonic acid against  
641 *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium*. **Antimicrob. Agents**  
642 **chemother.**, v.54, p.3383-3389, 2010.  
643

644 FALLON, P.G.; FOOKES, R.E.; WHARTON, G.A. Temporal differences in  
645 praziquantel and oxamniquine-induced tegumental damage to adult  
646 *Schistosoma mansoni*: implications for drug-antibody synergy. **Parasitology**,  
647 v.112, p.47-58, 1996.

648 FERRARI *et al.* Efficacy of Oxamniquine and Praziquantel in the treatment of  
649 *Schistosoma mansoni* infection: a controlled trial. **Bull World Health Organ.**,  
650 v.81, p.190-196, 2003.

651

652 FOSTER, R. A review of clinical experience with oxamniquine. **Trans. R. Soc.**  
653 **Trop. Med. Hyg.**, v.81, p.55-9, 1987.

654

655 FUNASA. Esquistossomose mansônica. In: **Guia de Vigilância**  
656 **Epidemiológica**. Fundação Nacional de Saúde, 5ª ed., v.1, p.277-286, 2002.

657

658 HARDER, A. Chemotherapeutic approaches to schistosomes: current knowledge  
659 and outlook. **Parasitol. Res.**, v.88, p.395-397, 2002.

660

661 HEPLER, P.K. Membranes in the mitotic apparatus of barley cells, **J. Cell.**  
662 **Biol.**, v.86, p.490-499, 1980

663

664 HOCKLEY, D.J. Ultrastructure of the tegument of *Schistosoma*. **Adv.**  
665 **Parasitol.**, v.11, p.233-305, 1973.

666

667 HOCKLEY, D.J. *Schistosoma mansoni*: the development of the cercarial  
668 tegument. **Parasitology**, v.64, p.245-52, 1972.

669

670 IBIKOUNLÉ *et al.* Freshwater snail diversity in Benin (West Africa) with a focus  
671 on human Schistosomiasis, **Acta Trop.**, v.111, p.28-34, 2009.

672

673 KATZ, N.; PEIXOTO, S.V. Análise crítica da estimativa do número de  
674 portadores de esquistossomose no Brasil. **Ver. Soc. Bras. Med.Trop.**, v.7,  
675 p.381-387, 2000.

676

677 KATZ, N.; ALMEIDA. K. Esquistossomose, xistosa, barriga d'agua. **Cien. Cult.**  
678 v.55, p.38-43, 2003.

679

680 LAMBERTUCCI, J.R.; SERUTO, J.C. *Schistosoma mansoni*: assessment of  
681 morbidity before and after control. **Acta Trop.**, v.77, p.101-109, 2000.

682 LAMBERTUCCI *et al.* Pyogenic abscesses and parasitic diseases. **Rev. Inst.**  
683 **Med. Trop.**, v.43, p.67-74, 2001.

684

685 LAMBERTUCCI, J.R.; SILVA, L.C.S.; AMARAL, R.S. Guidelines for the  
686 diagnosis and treatment of schistosomal myeloradiculopathy. **Rev. Soc. Bras.**  
687 **Med. Trop.**, v.40, p.574-581, 2007.

688

689 LIMA, V.L.C.A. Esquistossomose urbana e a heterogeneidade social e  
690 epidemiológica do Município de Campinas, São Paulo, Brasil. **Cad. Saúde**  
691 **Pública**, v.11, p.45-56, 1995.

692

693 LIMA, S.F.L.Q.; VIEIRA, L.Q.; HARDER, A. Altered behavior of carbohydrate-  
694 bound molecules and lipids in areas of the tegument of adult *Schistosoma*  
695 *mansoni* worms damaged by praziquantel. **Parasitology**, v.109, p.469-77,  
696 1994.

697

698 MAIZELS *et al.* Specificity of surface molecules of adult *Brugia* parasites: cross-  
699 reactivity with antibody from *Wuchereria*, *Onchocerca* and other human filarial  
700 infections. **Trop. Med. Parasitol.**, v.36, p. 233-237, 1985.

701

702 MAKINSON *et al.* Diagnostic approaches to imported schistosomal  
703 myeloradiculopathy in travelers. **Neurology**, v.71, p.66-7, 2008.

704

705 MARCHIORI, C.H. First occurrence of *Biomphalaria straminea* in the South  
706 Goiano, Brazil, **Rev. Saúde Pública**, v.33, p.622-623, 1999.

707

708 MELO, A.L.; COELHO, P.M.Z. *Schistosoma mansoni* e a doença. In: NEVES,  
709 D.P. Parasitologia Humana, Chile. 1º edição. São Paulo: **Editora Atheneu**,  
710 cap.34, p.193-212, 2005.

711

712 MEULEMAN, E. Host-parasite interrelationship between the freshwater  
713 pulmonate *Biomphalaria pfeifferi* and the trematode *Schistosoma mansoni*.  
714 **Neth. J. Zool.**, v.22, p.355-427, 1972.

715

716 MURRELL, K.D.; GRAHAM, C.E.; MCGREEVY, M. *Strongyloides ratti* and  
717 *Trichinella spiralis*: net charge of epicuticle. **Exp. Parasitol.**, v.55, p.331-339,  
718 1983.

719

720 NEVES, D.P. Parasitologia Humana – 11<sup>a</sup> ed., São Paulo: **Editora Atheneu**,  
721 2005.

722

723 OLIVEIRA *et al.* Recent advances in vaccine research against schistosomiasis  
724 in Brazil. **Acta Trop.**, v.108, p.256–62, 2008.

725

726 OSCHMAN, J.L.; WALL, B.J. Calcium binding to intestinal membranes. **J. Cell.**  
727 **Biol.**, v.55, p.58-73, 1972.

728

729 PAN, S.C. The fine structure of the miracidium of *Schistosoma mansoni*. **J.**  
730 **Invertebr. Pathol.**, v.36, p.307-372, 1980.

731

732 PARISE FILHO, R.; SILVEIRA, M.A.B. Panorama atual da esquistossomíase  
733 no mundo. **Ver. Bras. Cienc. Farm.**, v.37, p.123-135, 2001.

734

735 PHILIPP, M.; RUMJANECK, F.D. Antigenic and dynamic properties of helminth  
736 surface structures. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v.10, p.245-68, 1984.

737

738 PINHEIRO, J., MALDONADO, A., JR., ATTIAS, M. AND LANFREDI, R. M.  
739 Ultrastructure of the miracidium of *Echinostoma paraensei* Lie and Basch, 1967  
740 (Trematoda, Echinostomatidae). **Parasitol. Res.**, v.97, p.367–372, 2005.

741

742 PORDEUS *et. al.* Ocorrência das formas agudas e crônicas da  
743 esquistossomose mansônica no Brasil no período de 1997 a 2006: uma revisão  
744 de literatura. **Epidemiol. Serv. Saúde**, v.17, p.163-175, 2008.

745

746 PRATA, A. Esquistossomose mansoni. In: VERONESI, R. Tratado de  
747 Infectologia. 3<sup>a</sup> ed.rev.atual. São Paulo: **Editora Atheneu**, cap.106, p.1695-  
748 1720, 2006.

749

750 PROUDFOOT *et al.* Rapid changes in the surface of parasitic nematodes  
751 during transition from pre-to post-parasitic forms. **Parasitology**, v.107, p.107-  
752 117, 1993a.

753

754 PROUDFOOT *et al.* External stimuli and intracellular signalling in the modi-  
755 fication of the nematode surface during transition to mammalian host environment.  
756 **Parasitology**, v.107, p.559-566, 1993b.

757

758 RAGHAVAN *et al.* Comparative gene analysis of *Biomphalaria glabrata*  
759 hemocytes pre-and post-exposure to miracidium of *Schistosoma mansoni*. **Mol.**  
760 **Biochem. Parasitol.**, v.126, p.181–191, 2003.

761

762 REY, L. Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos  
763 ocidentais. 4ª ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2008.

764

765 RIBEIRO, P.J.; AGUIAR, L.A.K.; TOLEDO, C.F. Programa educativo em  
766 esquistossomose: modelo de abordagem metodológica. **Rev. Saúde Pública**,  
767 v. 38, p.415-421, 2004.

768

769 ROSS, A.G.; BARTLEY, P.B. Schistosomiasis. **N. Engl. J. Med.**, v.346, p.1212-  
770 1220, 2002.

771

772 RUPPERT E.E.; FOX R.S.; BARNES R.D., 2004, Invertebrate Zoology. 7ª ed.  
773 **Brooks/Cole**. p.213–215, 2004.

774

775 SAVIOLI *et al.* Progress in the prevention and control of schistosomiasis and  
776 soil-transmitted helminthiasis. **Parasitol. Int.**, v.53, p.103-113, 2004.

777

778 SILVA *et al.* Comparison of immune responses of *Shistosoma mansoni*-  
779 infected mice with distinct chronic forms of the disease. **Acta Trop.**, v.91,  
780 p.189–196, 2004.

781

782 SILVA, L.M.; OLIVEIRA, C.N.; ANDRADE, Z.A. Neuroschistosomiasis.  
783 Inadequacy of the murine model. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**; v.97, p.599-600,  
784 2002.

785

786 SILVA *et al.* Aspectos clínicos de um surto de esquistossomose aguda no  
787 Estado de Sergipe, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.33, p.376, 2000.

788

789 SCHNEIDER, O.; ZELCK, U.E. Differential display analysis of hemocytes from  
790 schistosome-resistant and schistosome-susceptible intermediate hosts.  
791 **Parasitol. Res.**, v.87, p.489-91, 2001.

792

793 SCHMIDT, G.D., ROBERTS, L.S. Trematoda: form, function and classification  
794 of digeneans. Chapter 15, 6<sup>a</sup> ed. **McGraw-Hill Comp.** 27p, 2000.

795

796 SPICER, S.S.; HARDIN, J.H.; GREENE, W.B. Nuclear precipitates in  
797 pyroantimonateosmium tetroxide-fixed tissues. **J. Cell. Biol.**, v.39, p.216-221,  
798 1968.

799

800 STIREWALT, M.A. *Schistosoma mansoni*: cercaria to schistosomule. **Adv.**  
801 **Parasitol.**, v.12, p.115-182, 1974.

802

803 TEMPONE, A.J.; BIANCONI, M.L.; RUMJANEK F.D. The interaction of human  
804 LDL with the tegument of adult *Schistosoma mansoni*. **Mol. Cell. Biochem.**,  
805 v.177, p.139–144, 1997.

806

807 THOMPSON, D.P.; GEARY, T.G. The structure and function of helminth  
808 surfaces. In: Biochemistry and Molecular Biology of Parasites (J. J. Marr, Ed.),  
809 1<sup>st</sup> ed. **Academic Press**, New York, pp. 203-232, 1995.

810

811 VAN HELLEMOND *et al.* A Function of the tegument of Schistosomes: Clues  
812 from the Proteome and Lipidome. **Int. J. Parasitol.**, v.36, p.691–699, 2006.

813

814 WHEARTER, P.R.; WILSON, R.A. The tegument of *Schistosoma mansoni*: a  
815 histochemical investigation. **Parasitology**, v.73, p.99-109, 1976.

816

817 WILSON, R.A.; BARNES, P.E. The tegument of *Schistosoma mansoni*:  
818 observations on the formation, structure and composition of cytoplasmic  
819 inclusions in relation to tegument function. **Parasitology**, v.68, p.239-258,  
820 1974.

821

822 WHO-WORLD HEALTH ORGANIZATION (2012). Report of the WHO informal  
823 consultation on schistosomiasis control. Geneva.  
824 [www.who.in/temas/esquistossomose/pt](http://www.who.in/temas/esquistossomose/pt). Acesso em: 02.11.2012.

825

826 XIAO *et al.* Effect of combined treatment with praziquantel and artemether on  
827 *Schistosoma japonicum* and *Schistosoma mansoni* in experimentally infected  
828 animals. **Acta Trop.**, v.80, p.9-18, 2001.

829

830 XIAO *et al.* Tegumental changes in adult *Schistosoma mansoni* harbored in  
831 mice treated with artemether. **J. Parasitol.**, v.86, p.1125-1132, 2000.

832

833 XIMENES *et al.*, Migration and urban schistosomiasis. The case of São  
834 Lourenço da Mata, Northeast of Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v.42, p.209-217,  
835 2000.

836

837 ZHANG *et al.* Histopathological changes in adult *Schistosoma japonicum*  
838 harbored in mice treated with a single dose of mefloquine. **Parasitol. Res.**,  
839 v.104, p.1407-1416, 2009.

840

841 **ARTIGO: Aspecto ultraestrutural e citoquímico da região tegumentar e**  
842 **subtegumentar do verme adulto macho de *Schistosoma mansoni***  
843 **Sambon, 1907**

844

845

846

847

848

849

850

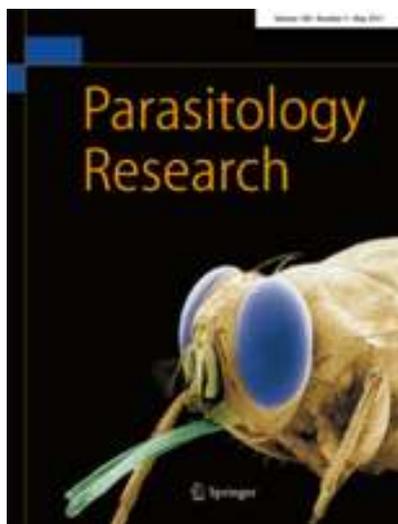
851

852

853

854

855



856 Artigo a ser submetido à revista Parasitology Research (Fator de Impacto 2,149)

857

858  
859  
860  
861  
862  
863  
864  
865  
866  
867  
868  
869  
870  
871  
872  
873  
874  
875  
876  
877  
878  
879  
880  
881  
882  
883  
884  
885  
886

**Aspecto ultraestrutural e citoquímico da região tegumentar e  
subtegumentar do verme adulto macho de *Schistosoma mansoni*  
Sambon, 1907**

Rafael José Ribeiro Padilha<sup>1</sup>, Luiz Carlos Alves<sup>1,2</sup>, Fábio André Brayner<sup>1,2</sup>, Maria  
Elizabeth Cavalcante Chaves<sup>1</sup>, Laurimar Thomé da Rocha<sup>2</sup>, José Luiz de Lima Filho<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - LIKA, Universidade Federal de  
Pernambuco, Recife-PE, 50670-901, Brasil

<sup>2</sup> Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - CPqAM/FIOCRUZ, Recife-PE, 50670-420,  
Brasil

\*Autor correspondente:

José Luiz de Lima Filho

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - LIKA

Av. Moraes Rego s/n, Campus da UFPE

CEP 50670-901, Recife, Pernambuco - Brasil

E-mail: [joseluiz60@gmail.com.br](mailto:joseluiz60@gmail.com.br)

Fone: +55 81 21268484

Fax: +55 81 2126848

887 **RESUMO**

888

889 O objetivo deste estudo foi caracterizar ultraestruturalmente o verme adulto de  
890 *Schistosoma mansoni* de 25, 45 e 130 dias, através de técnicas citoquímicas, utilizando  
891 a Microscopia Eletrônica de Transmissão. Foi utilizada a técnica de Hepler para  
892 localizar sítios de cálcio e a ferritina cationizada para evidenciar grupamentos aniônicos.  
893 O Imidazol foi usado para identificar lipídios insaturados e às técnicas do Ácido  
894 Fosfotúngstico (PTA) e da Prata Amoniacal para localizar proteínas básicas. A  
895 localização de sítios de cálcio mostrou-se bastante uniforme, demarcando todas as  
896 membranas, principalmente do tecido muscular do verme. A ferritina cationizada  
897 marcou fortemente no glicocálice e membrana da superfície tegumentar do verme. O  
898 tratamento com a condroitinase resultou em marcação pontual na superfície do verme.  
899 Foi observada a presença de lipídios insaturados de formato globular em toda a região  
900 tegumentar e subtegumentar do verme, sendo maior a concentração de lipídios à medida  
901 que o verme ficava mais velho. Identificamos forte marcação dos carboidratos ácidos  
902 pela ferritina cationizada na região tegumentar e subtegumentar do verme, e apenas os  
903 vermes com 45 dias teve marcação do glicocálice. Já o PTA marcou as proteínas básicas  
904 no núcleo e nucléolo de células subtegumentares para todos os vermes, além de corpos  
905 de inclusão e espículas do tegumento nos vermes com 45 e 130 dias. A identificação e  
906 localização desses compostos sugere que os mesmos estão relacionados às diversas  
907 funções das fases do *S. mansoni*, desde seu estabelecimento até a manutenção do  
908 parasito no hospedeiro. Assim, uma análise citoquímica dos estágios de vida do *S.*  
909 *mansoni* é de grande importância para que se possa compreender a base da persistência  
910 do parasita no hospedeiro, para o desenvolvimento de um diagnóstico preciso e bem  
911 como para um programa de imunização em áreas endêmicas.

912

913 **Palavras chaves:** Verme adulto. *Schistosoma mansoni*. Citoquímica. Ultraestrutura.

914

## 915 **Introdução**

916 Apesar de um século da sua descoberta e do grande número de pesquisas  
917 desenvolvidas, a esquistossomose atinge 77 países, envolvendo milhões de pessoas em  
918 países da África e América Latina (WHO 2012). De acordo com a literatura a  
919 esquistossomose é considerada um dos mais graves e complexos problemas de saúde  
920 pública no Brasil devido às falhas na tentativa de erradicar o molusco vetor, ao  
921 desenvolvimento de resistência do parasita às drogas anti-esquistossomóticas e à falta  
922 de uma vacina (Lawn et al. 2003). Sendo assim, o controle desta parasitose é  
923 considerado sob o aspecto da morbidade e o da transmissão. Para a morbidade, que visa  
924 diminuir o aparecimento de indivíduos com a forma grave, o diagnóstico e o tratamento  
925 são suficientes para o controle, apesar da quimioterapia em áreas de alta prevalência da  
926 esquistossomose não obter grande sucesso, havendo a rápida re-infecção. Em relação à  
927 transmissão, apenas o tratamento das populações infectadas não é suficiente sendo  
928 necessário também interromper o ciclo evolutivo do parasito no hospedeiro  
929 intermediário (CDC 2010).

930 Embora muitos pesquisadores e instituições de pesquisa de várias partes do  
931 mundo, venham se dedicando a estudos na busca de um possível controle, a  
932 esquistossomose continua em franca expansão. Na literatura encontramos alguns  
933 trabalhos caracterizando a morfologia de vermes adultos do *Schistosoma mansoni*  
934 submetidos ou não a tratamentos (Hockley and McLaren 1973; Van Hellemond et al.  
935 2006), porém nenhum deles enfocou a caracterização citoquímica. Apenas o trabalho de  
936 Cavalcanti et al. (2009), correlacionou a morfologia do parasito com a composição  
937 química, mesmo assim, os autores focaram na fase larval do *S. mansoni*, ou seja a  
938 cercária.

939 De acordo com Souza (1998), realizando a caracterização citoquímica  
940 ultraestrutural de um determinado sistema biológico é possível identificar a composição  
941 bioquímica “in loco” de proteínas, carboidratos, lipídios entre outros, permitido não só a  
942 identificação como também a localização e quantificação desses compostos que são de  
943 extrema importância para sobrevivência do parasito no hospedeiro.

944 O presente estudo tem como objetivo localizar sítios de cálcio, sítios aniônicos  
945 de carboidratos ácidos, lipídios insaturados e proteínas básicas em vermes machos de *S.*  
946 *mansoni*.

947

948 **Materiais e Métodos**

949 **Infecção de camundongos com isolado de *Schistosoma mansoni***

950 Trinta camundongos machos *Swiss Webster* com até 30 dias de idade, pesando  
951 entre 30 e 35g, oriundos do Biotério de Criação do Centro de Pesquisas Aggeu  
952 Magalhães / CPqAM - FIOCRUZ (mantidos recebendo água filtrada e autoclavada e  
953 ração *ad libitum* autoclavada, acomodados em gaiolas de polipropileno com fundo  
954 forrado com maravalha autoclavada, acondicionados à temperatura ambiente de 25°C,  
955 sendo submetidos a foto período de 12 horas) foram submetidos a infecção transcutânea  
956 de uma suspensão contendo aproximadamente 120 cercárias da cepa *S. mansoni*, Belo  
957 Horizonte (BH) – Minas Gerais. Os camundongos foram separados em 3 grupos  
958 contendo 10 indivíduos cada.

959

960 **Eutanásia dos camundongos e recuperação dos vermes adultos**

961 Após 25, 45 e 130 dias, da infecção, os animais foram eutanasiados de acordo  
962 com os protocolos estabelecidos pelo Biotério de Experimentação do Centro de  
963 Pesquisas Aggeu Magalhães / CPqAM - FIOCRUZ para recuperação dos vermes  
964 através da técnica de perfusão descrita por Duvall and Dewitt, (1967). Os períodos de  
965 25, 45 e 130 dias foram considerados como a idade dos vermes.

966

967 **Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV**

968 Os vermes machos *S. mansoni* foram fixados em glutaraldeído a 2,5%,  
969 formaldeído a 4,0% e tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7.2 por duas horas. Pós-fixados  
970 em tetróxido de ósmio 1% por uma hora e desidratados em séries crescentes de etanol  
971 (50, 70, 90 por 3 vezes em 15 minutos e 3x 100% por 10 minutos cada). Submetidos ao  
972 ponto crítico (HCP-2 – HITACHI) e metalizados no Fine Coat – 1100 – JEOL. As  
973 análises dos vermes foram feitas em microscópio eletrônico de varredura JEOL 5600LV  
974 (Núcleo de Integração Tecnológica-1 / Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/CPqAM-  
975 FIOCRUZ).

976

## 977 **Protocolo de Rotina para processamento da Amostra - MET**

978 As amostras foram fixadas em glutaraldeído (GA) a 2,5%, formaldeído (FA) a  
979 4%, em tampão cacodilato de sódio (T. caco) a 0,1M, pH 7,2, por 2 horas ou *overnight*  
980 em temperatura ambiente, lavadas no mesmo tampão e pós-fixadas em OsO<sub>4</sub> a 1% em  
981 tampão cacodilato de sódio a 0,1M, pH 7,2, por 1 hora. Após a pós-fixação foram  
982 lavadas no mesmo tampão, contrastadas em bloco com acetato de uranila a 2%, lavadas  
983 novamente e desidratadas em séries crescentes de acetona 30, 50, 70, 90 e três vezes a  
984 100%. A infiltração e o emblocamento foram realizados com a resina Epon.

985 Cortes ultrafinos foram efetuados no referido ultramicrotomo, com navalha de  
986 diamante e posteriormente, contrastados com acetato de Uranila a 5%, por 20 a 30  
987 minutos e citrato de chumbo 1%, por 5 a 10 minutos, dependendo da técnica utilizada.  
988 O exame das preparações e a obtenção das eletronicografias foram realizados através  
989 do microscópio eletrônico de transmissão – 100CX II – JEOL operando a 80 KV.

990

## 991 **Marcação Citoquímica**

992 Cerca de 5 vermes machos foram utilizados no processamento para cada técnica  
993 citoquímica descrita a seguir.

994

## 995 **Localização de Proteínas básicas**

996

997 **Técnica do Ácido Fosfotúngstico (PTA):** Os vermes foram fixados (glutaraldeído a  
998 2,5% em tampão cacodilato a 0,1M) *overnight* e lavado em tampão cacodilato a 0,1M,  
999 após a lavagem, o material foi desidratado em concentrações crescentes de etanol, em  
1000 seguida, o material foi incubado em PTA a 2% em etanol durante 2 horas em  
1001 temperatura ambiente. Após a incubação, foi realizada a lavagem em etanol puro, três  
1002 vezes por 10 minutos, e posteriormente, em etanol e acetona (1:1) por 10 minutos e  
1003 acetona absoluta três vezes por 10 minutos. Após a desidratação o material foi  
1004 embebido e emblocado em Epon (Gordom and Bensch 1968).

1005 **Técnica da Prata Amoniacal:** Após a obtenção dos vermes, os mesmos foram fixados  
1006 utilizando o glutaraldeído a 2.5% em tampão cacodilato a 0.1M. Após a fixação, o  
1007 material foi lavado exaustivamente em água destilada e posteriormente incubado por 5  
1008 minutos em uma solução de prata amoniacal. Após a incubação foi realizada uma  
1009 lavagem em água destilada e posteriormente o material foi incubado em formaldeído a  
1010 3% durante 5 minutos, lavado em água destilada e pós-fixado em ósmio a 1%. Depois,

1011 as amostras foram processadas seguindo o protocolo de rotina e observados no MET  
1012 (Mcrae and Meltz 1970).

1013 Para o controle das técnicas acima foi realizada uma acetilação, onde logo após a  
1014 fixação dos vermes foram colocados em uma solução de Ánido Acético p.a. a 10%  
1015 em Piridina durante 90 minutos. Após lavagem em água destilada, o material foi  
1016 desidratado, infiltrado e emblocado em Epon seguindo o protocolo de rotina.

1017

### 1018 **Localização de sítios de afinidade por Cálcio**

1019 Os vermes obtidos foram lavados e fixados em glutaraldeído a 2,5% em tampão  
1020 cacodilato 0,1M, pH 7,2 com CaCl<sub>2</sub> 5mM overnight a temperatura ambiente. Após a  
1021 fixação, o material foi lavado duas vezes em tampão cacodilato a 0,1M, pH 7,2  
1022 contendo 5mM de cloreto de cálcio durante 10 minutos. A pós-fixação foi realizada  
1023 utilizando ósmio a 1% em tampão cacodilato a 0,1M, pH 7,2 contendo 5mM de cloreto  
1024 de cálcio e 0,8% de ferricianeto de potássio durante 2 horas no escuro. Três lavagens  
1025 foram realizadas com tampão cacodilato a 0,1M contendo 5mM de cloreto de cálcio  
1026 durante 10 minutos (Hepler, 1980). Em seguida, foi realizada a desidratação e a inclusão  
1027 seguiu o protocolo de rotina e observados no MET.

1028 Para o controle da técnica, os cortes ultrafinos foram incubados em uma solução  
1029 de EDTA 5mM durante 30 minutos em temperatura de 60 °C, em seguida lavados com  
1030 água destilada e contrastados com acetato de uranila a 5% por 20 minutos e citrato de  
1031 chumbo a 1% durante 5 minutos.

1032

### 1033 **Localização de sítios Aniônicos em carboidratos ácidos**

1034

1035 **Técnica da Ferritina Cationizada:** Os vermes foram fixados em glutaraldeído a 2,5%  
1036 em tampão fosfato a 0.1M, pH 7.4 durante 2 horas em temperatura ambiente. Lavados  
1037 duas vezes em PBS pH 7.4 por 10 minutos e depois incubados em uma solução de  
1038 Cloreto de Amônio a 50mM em Tampão fosfato, pH 7.4 por 2 horas em temperatura  
1039 ambiente. Após lavagem no mesmo tampão, a amostra foi incubada por 60 minutos em  
1040 temperatura ambiente em uma solução contendo 100µg/mL de partículas de ferritina  
1041 cationizada, pH 7.2 (Danon et al. 1972). Após a incubação, as amostras foram lavadas  
1042 três vezes no mesmo tampão, desidratadas e infiltradas com resina Epon.

1043 Para o controle da técnica foi realizado o tratamento enzimático, onde os vermes  
1044 foram incubados por 5 minutos em uma solução contendo 500 mg/ml de tripsina (Sigma

1045 tipo III, pH7,2 ) ou por 60 minutos na presença de 0.03 U/ml de neuraminidase de  
1046 *Vibrio cholerae* (Sigma) em pH 6.0 ou por 18 horas na presença de 0.1 U/ml de  
1047 condroitinase AB (Sigma) pH 8.0. Todos esses tratamentos foram conduzidos em 37 °C  
1048 sob agitação (Souza et al. 1989).

1049

### 1050 **Localização de lipídeos insaturados**

1051

1052 **Técnica do tampão Imidazol:** Para a detecção de lipídeos, os vermes foram fixados em  
1053 solução de glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato 0,1 M (pH 7,2), as amostras  
1054 foram lavadas com o mesmo tampão e em seguida lavou-se em 0,1 M de tampão de  
1055 imidazol (pH 7,5). Os vermes foram pós-fixados numa solução contendo 2% de OsO<sub>4</sub>  
1056 em tampão de imidazol 0,1 M, pH 7.5 durante 30 minutos em temperatura ambiente,  
1057 lavados duas vezes por 10 minutos no mesmo tampão imidazol, desidratados em  
1058 acetona e embebidos em Epon 812 seguindo o protocolo de rotina. Secções ultrafinas  
1059 foram recolhidas e visualizadas por TEM, foram contrastadas por 10 minutos em  
1060 acetato de uranila a 5% e depois lavadas em água destiladas durante 30 segundos e  
1061 secadas. (Souza et al. 1989).

1062 Para o grupo controle, todos os passos acima mencionados foram feitos,  
1063 omitindo o tampão de incubação imidazol.

1064

## 1065 **RESULTADOS**

1066

### 1067 **Morfologia geral do verme adulto de *Schistosoma mansoni***

1068 A morfologia geral dos vermes de *S. mansoni* 25 dias, 45 dias e 130 dias foi  
1069 analisada através da microscopia eletrônica de varredura e transmissão (Fig. 6 A-F).  
1070 Todos os vermes contém as mesmas estruturas externas como ventosa oral, ventosa  
1071 ventral ou acetábulo, canal ginecóforo, além do corpo recoberto por tubérculos e  
1072 espículas que são facilmente visíveis caracterizando o tegumento do verme (Figs. 6 A-  
1073 C). Sob o tegumento do verme observar-se, consecutivamente, a lâmina basal e arranjo  
1074 de músculos fibrosos circulares e longitudinais, células subtegumentares e células  
1075 digestivas, além de inclusões lipídicas em várias regiões do corpo do verme (Figs. 6D e  
1076 6E). Ainda no tegumento possível evidenciar a superfície da membrana tegumentar,  
1077 corpos membranosas, bolsas tegumentares, mitocôndrias e estruturas eletrondensas

1078 denominadas de corpos de inclusão que podem se apresentar no formato esférico,  
1079 alongado ou discóide (Fig. 6F).

1080

### 1081 **Localização de Sítios de Cálcio**

1082         Analisando as eletromicrografias dos vermes adultos de *S. mansoni* de 25, 45 e  
1083 130 dias incubados com cloreto de cálcio, podemos observar a presença de sítios de  
1084 cálcio através da eletrondensidade nas estruturas do verme, na região do tegumento, na  
1085 superfície da membrana tegumentar, corpos de inclusão, mitocôndrias e bolsas  
1086 tegumentares. Também foram observados sítios de cálcio na musculatura circular,  
1087 musculatura longitudinal, membranas das bolsas subtegumentares, mitocôndrias,  
1088 membranas dos núcleos das células subtegumentares e células digestivas (Figs. 7B-D e  
1089 8B-F).

1090         Nos grupos controles de 25, 45 e 130 dias que foram tratados com EDTA não foi  
1091 possível evidenciar marcações eletrondensas indicativas de sítio de cálcio nas áreas do  
1092 tegumento, nas membranas tegumentares, musculatura circular e musculatura  
1093 longitudinal e células subtegumentares (Figs. 7A, 8A e 8B).

1094

### 1095 **Localização de Sítios Aniônicos de Carboidratos Ácidos pela Ferritina Cationizada**

1096         Os vermes adultos de *S. mansoni* de 25, 45 e 130 dias incubados com a ferritina  
1097 cationizada mostraram uma marcação no glicocálice e na superfície do tegumento (Figs.  
1098 9B, 9E e 9H). Com um maior aumento foi possível visualizar a presença de marcação  
1099 nas bolsas tegumentares dos vermes com 130 dias (Fig. 9H). Observamos que a  
1100 intensidade da marcação foi aumentando a medida que o verme foi envelhecendo.

1101         Na análise dos vermes adultos *S. mansoni* controles nos períodos de 25, 45 e 130  
1102 dias, não observado marcações eletrodensas na superfície do tegumento e glicocálice  
1103 (Figs. 9A, 9D e 9G).

1104

### 1105 **Tratamento Enzimático**

1106         Como resultado foi possível observar que houve uma alteração no perfil de  
1107 marcação da superfície do tegumento do verme (Figs. 9C, 9F e 9I).

1108         O tratamento com a enzima proteolítica condroitinase específica para quebra de  
1109 grupamentos de sulfeto revelou apenas uma marcação pontual na superfície do  
1110 tegumento (Fig. 9C). Por outro lado o tratamento com a tripsina específica para quebra  
1111 de grupamentos carboxilas de ácido urônico e derivados mostrou que a intensidade da

1112 marcação foi moderada na superfície do tegumento (Fig. 9F). Já a neuraminidase que  
1113 tem especificidade para terminações de grupamento carboxila de ácido siálico  
1114 praticamente manteve o perfil de marcação da ferritina (Fig. 9I) quando comparado ao  
1115 grupo sem tratamento enzimático (Fig. 9E).

1116

### 1117 **Localização de Lipídios Insaturados pelo Imidazol**

1118 As inclusões lipídicas de ácidos graxos insaturados em vermes adultos de *S.*  
1119 *mansoni* com 25, 45 e 130 dias, após foram observadas marcações eletrodensas nas  
1120 regiões do tegumento e subtegumento (Figs. 10, 11 e 12).

1121 Analisando os vermes com 25 dias, observamos a presença de marcações  
1122 eletrodensas nas membranas, corpos de inclusões, bolsas tegumentares, mitocôndrias  
1123 (Figs. 10B-F), nos músculos circulares, músculos longitudinais (Figs. 10B e 10C),  
1124 membranas das estruturas das células subtegumentares (Figs. 10B e 10F). Com maior  
1125 aumento foi possível observar que a superfície da membrana tegumentar e da membrana  
1126 da espícula é composta por lipídios insaturados, além das bolsas e estruturas  
1127 membranosas presentes no tegumento (Figs. 10C-E). É importante dizer que poucas  
1128 inclusões lipídicas de forma globular foram visualizadas nas regiões tegumentares e  
1129 subtegumentares do verme.

1130 Por outro lado, os vermes de 45 dias apresentaram alguns tubérculos, a região  
1131 muscular circular e longitudinal, bem como a região do subtegumento apresentavam  
1132 inclusões lipídicas eletrondensas, de diâmetros variados, marcadas pelo imidazol (Figs.  
1133 11B-F). Em detalhe vimos que a membrana da superfície do tegumento, das bolsas  
1134 tegumentares, mitocôndria e os corpos de inclusão apresentaram-se eletrondensos (Fig.  
1135 11D). Na região subtegumentar, próximo às células dos ductos secretores, visualizamos  
1136 mitocôndrias e célula flame com todas as suas membranas marcadas (Figs. 11E-F).

1137 Uma maior quantidade de inclusões de lipídios eletrondensas foi observada no  
1138 interior dos vermes com 130 dias. Além disso, comparando com as inclusões de lipídios  
1139 encontrados nos vermes de 25 e 45 dias, observamos que as inclusões lipídicas dos  
1140 vermes com 130 dias apresentam uma maior eletrondensidade (Figs. 12B-F). Marcações  
1141 na superfície da membrana tegumentar, glicocálice, tubérculo, regiões musculares e  
1142 subtegumentares podem ser observadas nas Figuras 12B-D e 12F. Observando em  
1143 detalhe o tegumento, além da presença de inclusão lipídica vimos que estruturas como  
1144 as bolsas tegumentares, mitocôndrias e corpos de inclusão estavam marcados (Fig.

1145 12D). Pequenas partículas lipídicas bastante eletrondensas foram visualizadas no  
1146 glicocálice, região muscular e subtegumentar do verme (Figs. 12B-C e 12F).

1147 Nos grupos controle, os vermes com 25 dias (Fig. 10A), 45 dias (Fig. 11A) e 130  
1148 dias (Fig. 12A) que não foram incubados com o tampão imidazol foi visualizado a  
1149 presença de inclusões lipídicas no interior do verme de forma globular de tamanhos  
1150 variados, porém com uma menor eletrodensidade, quando comparado com as inclusões  
1151 de lipídios insaturados marcados com o imidazol.

1152

### 1153 **Localização de proteínas Básicas: Prata Amoniacal e PTA**

1154 As técnicas de citoquímica para detecção das proteínas básica nos vermes  
1155 adultos de *S. mansoni* com 25, 45 e 130 dias, após as incubações na Prata Amoniacal e  
1156 PTA, mostrou a presença de proteínas básicas ricas em arginina, lisina revelada pela  
1157 técnica da prata amoniacal e as proteínas ricas em histidina foram reveladas pela técnica  
1158 do PTA (Figs. 13A-I e 14A-E).

1159 Os vermes com 25 dias apresentaram-se marcados, de forma homogênea, com  
1160 partículas de prata amoniacal na região do tegumento e subtegumento (Fig. 13B).

1161 Quando foram analisados os vermes com 45 dias, encontramos a região do  
1162 tegumento e subtegumentos marcados com as partículas de prata, com maior  
1163 concentração no glicocálice, região muscular, núcleos das células subtegumentares e  
1164 núcleos das células digestivas (Figs. 13C-F). É importante ressaltar que a marcação do  
1165 glicocálice foi observada apenas nos vermes de 45 dias. Em detalhe foi observada  
1166 marcação nas mitocôndrias das células subtegumentares (Figs. 13G). Observamos uma  
1167 maior marcação de partículas eletrodensas nos vermes com 45 dias quando comparado  
1168 aos vermes de 25 e 130 dias.

1169 Nos vermes com 130 dias a marcação foi encontrada no tegumento, musculatura  
1170 e núcleo das células subtegumentares (Fig.s 13H-I).

1171 Analisando o grupo controle da prata amoniacal podemos observar ausência de  
1172 partículas eletrodensas na superfície do tegumento do verme, tegumento, musculatura  
1173 circular, musculatura longitudinal e na região subtegumentar (Fig. 13A).

1174 Os vermes com 25 dias incubados com o ácido fosfotúngstico (PTA) não  
1175 apresentou marcação no tegumento nem na região muscular, as proteínas foram  
1176 marcadas apenas nos núcleos e nucléolos das células subtegumentares (Fig. 14B). Por  
1177 outro lado, os vermes com 45 e 130 dias apresentaram o mesmo perfil de marcação,  
1178 onde podemos visualizar marcações eletrodensas nas espículas do tegumento do verme

1179 (Fig. 14C), corpos de inclusões (Fig. 14D) e núcleo e nucléolo das células da região  
1180 subtegumentar (Fig. 14E). No grupo controle do PTA observou-se ausência de  
1181 marcação eletrodensas na superfície tegumento do verme, como também nas  
1182 musculaturas circular e longitudinal e na região subtegumentar (Fig. 14A).

1183

## 1184 **DISCUSSÃO**

### 1185 **Morfologia Geral**

1186 Os vermes de *S. mansoni* independente da idade apresentaram morfologia  
1187 delgada e longa. O tamanho do macho de *S. mansoni* medindo cerca de 1,0 cm de  
1188 comprimento e sua coloração branca, além da presença da ventosa oral, ventosa ventral  
1189 e canal ginecóforo já havia sido descritos por Neves (2005) e Rey (2008).

1190 A superfície do tegumento dos vermes exibiu grande quantidade de pequenos  
1191 tubérculos, que encontravam-se mais abundantes na superfície dorsal. A presença de  
1192 estruturas mais delicadas puderam ser observadas através da microscopia eletrônica de  
1193 transmissão e varredura, consistindo de minúsculas espículas situadas na superfície do  
1194 verme. Logo abaixo do tegumento estão as camadas musculares da parede do corpo do  
1195 helminto, responsáveis pela movimentação e todo espaço interior entre os órgãos  
1196 internos conhecidos como bolsas subtegumentares, ocupado por um tecido denominado  
1197 estroma, formado de células subtegumentares e lacunas cheias de um líquido  
1198 intersticial. Estas mesmas estruturas podem ser observadas em Neves (2005).

1199 O tegumento de *S. mansoni* é uma importante interface entre o parasita e seu  
1200 ambiente intravascular no hospedeiro (Araújo et al. 1993). Através deste tegumento  
1201 especializado, os vermes adultos realizam três atividades básicas para sua  
1202 sobrevivência: assimilar nutrientes de sangue do hospedeiro; são capazes de escapar à  
1203 resposta imune do hospedeiro contra a sua presença (Abath and Werkhavser 1996) e  
1204 regenerar a partir de lesões induzidas (Popiel et al.1985). Outros estudos demonstraram  
1205 que o tegumento trematódeo é estruturalmente adaptado para o transporte, evasão  
1206 imunológica e comunicação com o sistema neuromuscular, além disso, numerosos  
1207 poços na superfície do tegumento aumentam significativamente a área de superfície do  
1208 parasita, o que é caracterizado como uma função de transporte (Thompson and Geary  
1209 1995). Na verdade, essas atividades estão intimamente relacionadas com a composição  
1210 bioquímica das estruturas do verme que podem variar em quantidade e localização ao  
1211 longo de sua evolução no interior de seu hospedeiro.

1212

### 1213 **Localização de Sítios de Cálcio**

1214 Na literatura encontramos alguns estudos sobre a localização do cálcio em *S.*  
1215 *mansoni*, porém na fase larval, nenhuma abordagem ultraestrutural. A elucidação da  
1216 localização de depósitos de cálcio no verme através da ultraestrutura é importante para  
1217 tentar correlacionar a localização “*in loco*” com a função.

1218 Nossos resultados revelaram a presença de sítios de cálcio em todas as regiões  
1219 dos vermes adultos independente da idade. De acordo com a marcação, o íon está  
1220 distribuído de forma regular nas estruturas tegumentares e subtegumentares,  
1221 principalmente na musculatura e parece demarcar ainda os todos os espaços internos e  
1222 algumas organelas do verme. Esses achados também foram evidenciados por Cavalcanti  
1223 et al. (2009), analisando a presença dos sítios de íons na cercaria de *S. mansoni*.

1224 Segundo SOUZA (2005), os íons de cálcio desempenham papel de muita  
1225 relevância em uma série de atividades celulares e estão envolvidos com a contração  
1226 muscular, o movimento de cílios e flagelos, despolarização, secreção, ativação de  
1227 microtúbulos e microfilamentos, endocitose e exocitose. Certamente alguns desses  
1228 processos como a contração da musculatura para locomoção (Cavalcanti et al. 2009),  
1229 secreção ativada pela presença de cálcio nas glândulas pré-acetabulares e ductos de *S.*  
1230 *mansoni* (Lewert et al. 1966), endocitose e exocitose (Thompson and Geary, 1995) já  
1231 foram elucidados no *S. mansoni* e provavelmente justifique a marcação encontrada em  
1232 nossas amostras.

1233 Nesse estudo, pela localização do cálcio apresentada podemos sugerir que o  
1234 sucesso no estabelecimento e sobrevivência do parasito no hospedeiro depende da  
1235 presença de íons cálcio nas estruturas do verme.

1236

### 1237 **Localização de Sítios Aniônicos de Carboidratos Ácidos pela Ferritina Cationizada**

1238 Carboidratos estão expostos na superfície do verme na forma de glicolipídios e  
1239 glicoproteínas ligados na membrana do tegumento, a qual também contém as enzimas  
1240 necessárias para a sua biossíntese (Thompson and Geary, 1995).

1241 Alguns autores relacionaram a presença de grupamentos carregados  
1242 negativamente na superfície de helmintos com a proteção contra a perda de conteúdos  
1243 internos (Murrel et al. 1983). Por outro lado, é possível que tais grupamentos ativem o  
1244 sistema complemento do hospedeiro via fator de Hageman ou fator VII da coagulação, e  
1245 consequentemente, desencadeando reações inflamatórias (Thompson and Geary 1995).

1246           Através da ligação da ferritina cationizada na camada mais externa do parasito,  
1247 observamos a presença de sítios aniônicos associados com o glicocálice e na superfície  
1248 do tegumento do verme, e em especial nas bolsas tegumentares para os vermes com 130  
1249 dias. Esses resultados também foram observados em estudos citoquímicos com a larva  
1250 cercarial de *S. mansoni* (Cavalcanti et al 2009), larva L3 de *Wuchereria bancrofti* (Silva  
1251 et al. 2006) e vermes adultos de *Strongyloides ratti* e *Trichinella spirallis* (Murrel et al.  
1252 1983).

1253           O tratamento das amostras com a neuraminidase, seguido de incubação com  
1254 ferritina cationizada não alterou o padrão de marcação dessas partículas na superfície do  
1255 trematóide. Nossa observação utilizando a neuraminidase de elevada especificidade  
1256 indica que grupamentos carboxílicos não estão envolvidos na carga de superfície do  
1257 verme de *S. mansoni*. Estes resultados estão de acordo com o que foi observado por  
1258 Cavalcanti et al. (2009) trabalhando com cercaria de *S. mansoni* e Himmelhoch and  
1259 Zucherman (1978) com o nematoide de vida livre *Caenorhabditis briggsae*.

1260           O tratamento com tripsina resultou numa moderada marcação nas cargas  
1261 negativa de superfície do verme, esta observação vai de encontro aos achados de  
1262 Cavalcanti et al. (2009) onde houve eliminação da marcação pela ferritina indicando  
1263 que as glicoproteínas sensíveis a tripsina devem estar contribuindo de forma  
1264 significativa na superfície negativa da cercária.

1265           Os resultados com o tratamento dos vermes com condroitinase AB que possui  
1266 especificidade para condroitina-4-sulfato e dermatan sulfato (B) teve maior ação sobre  
1267 as cargas de superfície negativa permitindo apenas marcação pontual de partículas de  
1268 ferritina cationizadas. Esta observação sugere que a presença de glicosaminoglicanas no  
1269 tegumento do verme de *S. mansoni*. Porém, mais estudos bioquímicos são necessários  
1270 para confirmar esta observação citoquímica.

1271

### 1272 **Localização de Lipídios Insaturados pelo Imidazol**

1273           A técnica utilizada para a detecção de lipídios insaturados foi a do tampão  
1274 imidazol que emprega o complexo ósmio-imidazol. Através da utilização desta técnica  
1275 foi possível evidenciar que os vermes de *S. mansoni* tratados com tampão imidazol  
1276 apresentaram uma marcação mais evidente à medida que a idade do parasita aumentava.  
1277 Obsevando com maior detalhe no verme mais velho ficou claro que o material  
1278 fragmentado presente no glicocálice, superfície do tegumento e nas regiões  
1279 tegumentares e subtegumentares possui na sua composição lipídios insaturados, por

1280 apresentarem eletrondensidade similares às encontradas nas inclusões. Cavalcanti et al.  
1281 (2009) evidenciaram a presença de lipídios insaturados em toda superfície de cercarias  
1282 de *S. mansoni*, e sugeriu que este material lipídico esteja servindo como um agente  
1283 facilitador na aproximação e estabelecimento do parasita no hospedeiro.

1284         Acredita-se que o *S. mansoni* utiliza os lipídios em alguns processos que são  
1285 vitais para a sua sobrevivência em longo prazo dentro do hospedeiro mamífero. Os  
1286 lipídios são necessários pelo parasita não só para manter a sua integridade superficial e  
1287 requisitos estruturais, mas também para a produção de ovos e sinalização célula-célula.  
1288 No entanto, *S. mansoni* é incapaz de sintetizar os próprios lipídios essenciais e devem  
1289 obter estes a partir do seu hospedeiro (Furlong 1991; Fried 1991).

1290         Uma vez que este componente encontra-se mais evidente a medida que o verme  
1291 vai ficando mais velho, é possível que esses lipídios suprima a resposta imune do  
1292 hospedeiro ou ajude o verme a passar despercebido (Araújo et al. 1993). Outros autores  
1293 acreditam que estes lipídios possam ser sintetizados a partir da gordura absorvida do  
1294 hospedeiro para auxiliar na nutrição dos vermes (Ivanov 1950; Furlong 1991; Araújo et  
1295 al. 1993).

1296         Os lipídios insaturados foram evidenciados no tegumento, região tegumentar e  
1297 subtegumentar. Possivelmente alguns órgãos do parasita podem produzir material para  
1298 reparar e reorganizar o tegumento do verme após a penetração e estabelecimento no  
1299 hospedeiro (Hockley and McLaren 1973). Como observamos a presença de material  
1300 lipídico em várias regiões do verme, é possível que entre os componentes reparadores  
1301 existam lipídios insaturados. Além disso, Cavalcanti et al. 2009 sugeriram, outra  
1302 possível função da presença de inclusões lipídicas no tegumento do verme é que estas  
1303 podem estar relacionadas com a proteção do parasita às adversidades do meio onde se  
1304 encontram.

1305         Sabemos que a localização ultraestrutural de lipídios insaturados nos vermes de  
1306 *S. mansoni* não fornece informações concretas da origem destes compostos, uma vez  
1307 que os nossos resultados não deixou clara a origem deste componente. Porém, com os  
1308 dados encontrados neste estudo podemos afirmar que a quantidade desses lipídios  
1309 aumenta de acordo com a permanência do verme no hospedeiro vertebrado.

1310

### 1311 **Localização de proteínas Básicas: Prata Amoniacal e PTA**

1312         Detectamos as proteínas básicas através da ultraestrutura utilizando duas  
1313 técnicas citoquímicas específicas que foram a prata amoniacal e o ácido fosfotúngstico

1314 ou PTA. Estas localizam a presença de proteínas básicas, porém com especificidades  
1315 diferentes, a prata amoniacal, identifica as proteínas ricas em arginina e lisina, enquanto  
1316 o PTA revela proteínas ricas em histidinas (Souza 1998).

1317           Em um estudo citoquímico realizado com a fase larval do *S. mansoni*, os  
1318 autores identificaram uma forte marcação com a prata amoniacal sobre toda superfície  
1319 da larva infectante, além do tecido muscular (Cavalcanti et al. 2009). Esta marcação foi  
1320 confirmada em nossos estudos tanto no verme mais jovem como no verme mais velho,  
1321 porém curiosamente nos vermes com 45 dias, além dessas estruturas apresentarem  
1322 proteínas básicas, o glicocálice estava intensamente marcado, provavelmente  
1323 desempenhando alguma função específica.

1324           Sabe-se que o glicocálice apresenta-se perpendicular à superfície do  
1325 tegumento do verme e é composta por fibras ramificadas e interconectadas formando  
1326 uma rede difusa (Morris 1971; Hockley 1972; Stein; Lumsden 1973). Porém, outros  
1327 trabalhos revelaram que o glicocálice é uma parte integral da membrana externa do  
1328 tegumento e é provavelmente produzido pelo tegumento, pelo fato de que algumas  
1329 fibras que formam o glicocálice estarem firmemente inseridas na membrana externa do  
1330 tegumento (Kemp 1970; Stein and Lumsden 1973).

1331           Apesar do papel do glicocálice não ter sido completamente elucidado, há uma  
1332 grande variedade de possíveis funções para o mesmo como: adesão e lubrificação  
1333 (Kruidenier 1951), proteção contra adversidades do meio (Kruidenier 1951, 1953A,  
1334 1953B; Stirewalt 1963), controle da permeabilidade (Morris 1971; Stein; Lumsden  
1335 1973) e adaptação fisiológica (Kruidenier 1951; Morris 1971).

1336           Utilizando a técnica de PTA identificamos a presença de proteínas básicas nos  
1337 corpos de inclusão e espículas no tegumento, núcleo e nucléolo de células  
1338 subtegumentares.

1339           Dorsey et al. (2002) identificaram que corpos de inclusão, presentes no  
1340 tegumento cercarial originam-se do complexo de golgi e apresentam como função a  
1341 formação da membrana heptalaminar externa. Como esta membrana apresenta em sua  
1342 constituição proteínas, é possível que muitas delas sejam básicas por serem originadas  
1343 dos corpos de inclusão, além das espículas, que foram marcadas no tegumento do verme  
1344 adulto.

1345           Como o PTA detecta proteínas ricas em histidina e estas estão comprometidas  
1346 numa série de funções celulares tais como a diferenciação celular e a regulação da

1347 função gênica de células eucarióticas, a identificação dessas proteínas no núcleo e  
1348 nucléolo de células subtegumentares do verme confirma a especificidade da reação.

1349         Através da análise da presença de cálcio, grupamentos aniônicos, lipídios e  
1350 proteínas básicas, no verme de *S. mansoni* concluímos que a localização desses  
1351 compostos está fortemente relacionada às diversas funções desempenhadas pelo verme  
1352 que permite o seu estabelecimento e manutenção no hospedeiro, onde estes compostos  
1353 podem servir como alvo para estudos de controle do parasita.

1354

1355 Agradecimentos: Os autores agradecem ao Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami  
1356 da Universidade Federal de Pernambuco (LIKA-UFPE) e Centro de Pesquisas Aggeu  
1357 Magalhães (CPqAM-FIOCRUZ) pelo suporte técnico, uso das instalações e  
1358 financiamento.

1359

#### 1360 **Referências**

1361 Abath FG, Werkhauser RC (1996) The tegument of *Schistosoma mansoni*: functional  
1362 and immunological features. *Parasite Immunol* 18(1):15-20.

1363 Araujo AC, Souto-Padron T, De Souza W (1993) Cytochemical localization of  
1364 carbohydrate residues in microfilariae of *Wuchereria bancrofti* and *Brugia malayi*.  
1365 *J. Histochem Cytochem* 41(4):571-578.

1366 Cavalcanti MGS, Araújo HR, Paiva MH, Silva GM, Barbosa CC, Silva LF, Brayner  
1367 FA, Alves LC (2009) Ultrastructural and cytochemical aspects of *Schistosoma*  
1368 *mansoni* cercaria. *Micron* 40 (3):394-400.

1369 CDC-CENTERS FOR DISEASE CONTROL Schistosomiasis. Atlanta. 2010.  
1370 Disponível em: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Schistosomiasis.htm>. Acesso  
1371 em: 14/2/2013.

1372 Danon D, Goldstein L, Marikovsky Y, Skutelsky E (1972) Use of cationized ferritin as  
1373 a label of negative charges on cell surfaces. *J Ultrastruct Res* 38(5):500-510.

1374 Dorsey CH, Cousin CE, Lewis FA, Stirewalt MA (2002) Ultrastructure of the  
1375 *Schistosoma mansoni* cercaria. *Micron* 33(3):279-323.

1376 Fried B (1991) Role of lipids in *Schistosoma mansoni*. *Parasitol Today*. 7(8):204.

1377 Furlong ST (1991) Unique roles for lipids in *Schistosoma mansoni*. *Parasitol Today*  
1378 7(2):59-62.

1379 Gordon M, Bensch KG (1968) Cytochemical differentiation of the guinea pig sperm  
1380 flagellum with phosphotungstic acid. *J Ultrastruct Res*. 24(1):33-50.

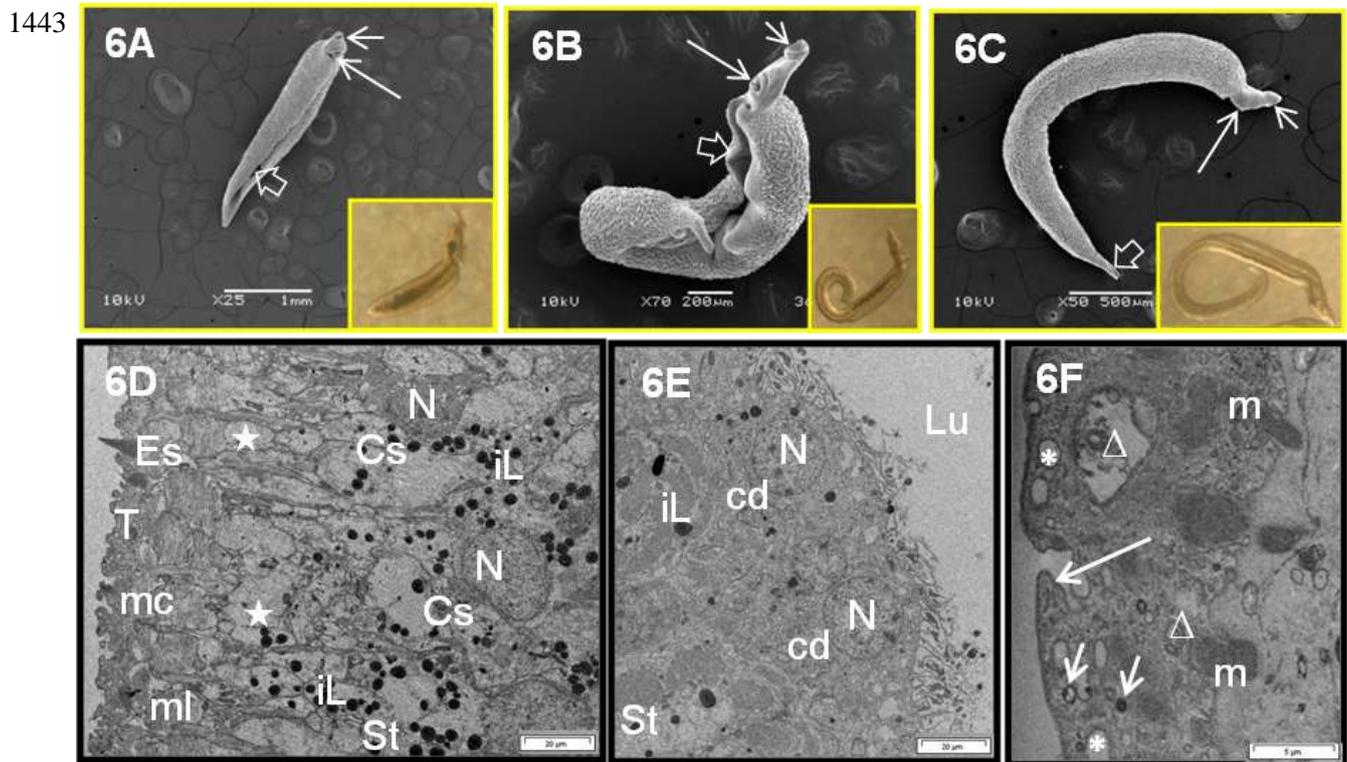
1381 Himmelhoch S, Zuckerman BM (1978) *Caenorhabditis briggsae*: aging and the  
1382 structural turnover of the outer cuticle surface and the intestine. *Exp Parasitol*  
1383 45(2):208-214.

1384 Hockley DJ, McLaren DJ (1973) *Schistosoma mansoni*: changes in the outer membrane  
1385 of the tegument during development from cercaria to adult worm. *Int J Parasitol*  
1386 3(1):13-25.

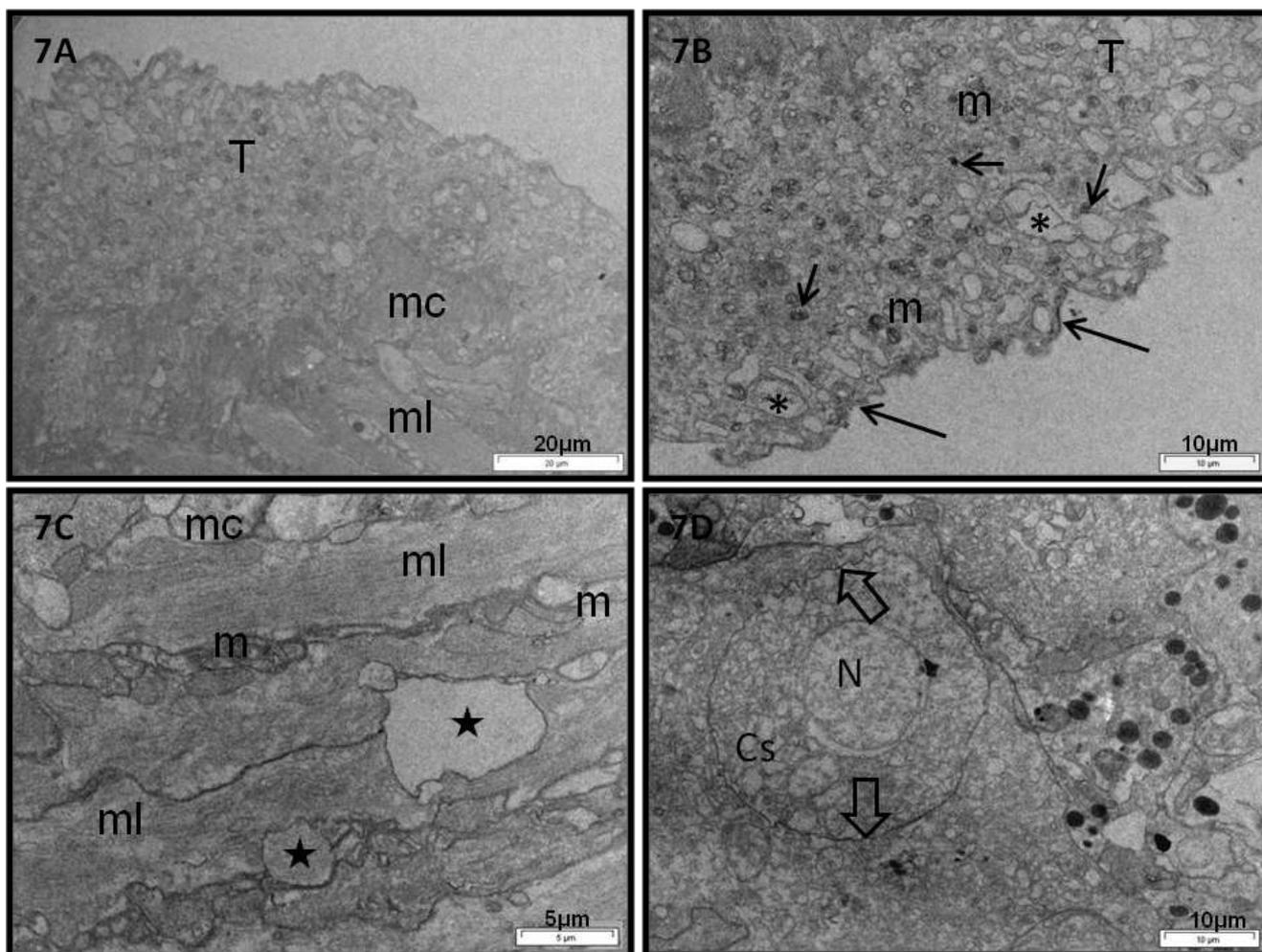
1387 Hockley DJ (1972) *Schistosoma mansoni*: the development of the cercarial tegument.  
1388 *Parasitol* 64(2):245-252.

- 1389 Ivanov II (1950) On the biochemistry of the muscular apparatus of helminths. *Trusdy,*  
1390 *Vsesoiuz* 4:51-57.
- 1391 Kemp WM (1970) Ultrastructure of the Cercarialhüllen Reaktion of *Schistosoma*  
1392 *mansoni* *J Parasit* 56:713-723.
- 1393 Kruidenier FJ (1951) The formation and function of mucoids in virgulate cercariae,  
1394 including study of the virgula organ. *Am Midl Nat* 46:660-683.
- 1395 Kruidenier FJ (1953a) Studies on the formation and function of mucoide glands in  
1396 cercariae: *opisthorchoid cercariae*. *J Parasit* 39:385-391.
- 1397 Kruidenier FJ (1953b) Studies on the formation and function of mucoide glands in  
1398 cercariae: *non-virgulate xiphodiocercariae*. *Am Midl Nat* 50:382-396.
- 1399 Lawn SD, Lucas SB, Chiodini PL (2003) Case report: *Schistosoma mansoni* infection:  
1400 failure of standard treatment with praziquantel in a returned traveler. *Trans R Soc*  
1401 *Trop Med Hyg* 97:100-101.
- 1402 Lewert RM, Hopkins DR, Mandlowitz S (1966) The role of calcium and magnesium  
1403 ions in invasiveness of *schistosome cercariae*. *Am J Trop Med Hyg* 15(3):314-323.
- 1404 Morris GP (1971) The fine structure of the tegument and associated structures of the  
1405 cercaria of *Schistosoma mansoni*. *Z Parasitenkd* 36:15-31.
- 1406 Mostafa OM, Dajem SM. (2010) Effects of *Schistosoma mansoni* experimental  
1407 infection on some inorganic elements in the snail host *Biomphalaria alexandrina*. *J*  
1408 *Egypt Soc Parasitol* 40(1):197-204.
- 1409 Murrell KD, Graham C E, Mcgreevy M (1983) *Strongyloides ratti* and *Trichinella*  
1410 *spiralis*: net charge of epicuticle. *Exp Parasitol* 55(3):331-339.
- 1411 Neves DP (2005) *Parasitologia Humana - 11<sup>o</sup>ed.* São Paulo: Editora Athene.
- 1412 Popiel I, Irving DL, Basch PF (1985) Wound healing in the trematode *Schistosoma*.  
1413 *Tissue Cell* 17(1):69-77.
- 1414 Rey L (2008) *Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos*  
1415 *ocidentais. 4<sup>th</sup> ed,* Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.
- 1416 Silva LF, Alves LC, Santos SS, Cavalcanti MG, Peixoto CA (2006) Cytochemical  
1417 characterization of the third-stage larva of *Wuchereria bancrofti* (Nematoda:  
1418 Filarioidea). *Parasitol Res* 99(1):14-20.
- 1419 Souza W (1998) *Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicada às ciências*  
1420 *biológicas: Sociedade Brasileira de Microscopia, 179pp.*
- 1421 Stein PC, Lumsden RD (1973) *Schistosoma mansoni*: topochemical features of  
1422 cercariae, schistosomula, and adults. *Exp Parasitol* 33(3):499-514.
- 1423 Stirewalt MA (1963) Cercaria vs. schistosomule (*Schistosoma mansoni*): absence of the  
1424 pericercarial envelope in vivo and the early physiological and histological  
1425 metamorphosis of the parasite. *Exp Parasitol* 13:395-406.
- 1426 Thompson DP, Geary TG (1995) The structure and function of helminth surfaces. In:  
1427 *Biochemistry and Molecular Biology of Parasites (J. J. Marr, Ed.), 1<sup>st</sup> ed,* Academic  
1428 *Press, New York, pp. 203-232.*
- 1429 Van Hellemond JJ, Van Balkom BW, Van Gestel RA, Brouwers JF, Krijgsveld J,  
1430 Yazdanbakhsh M, Shoemaker CB, Tielens AG (2006) A Function of the tegument  
1431 of *Schistosomes*: Clues from the Proteome and Lipidome. *Int J Parasitol* 36:691-  
1432 699.
- 1433 WHO-WORLD HEALTH ORGANIZATION. (2012) Report of the WHO informal  
1434 consultation on schistosomiasis control. Geneva.  
1435 [www.who.in/temas/esquistossomose/pt](http://www.who.in/temas/esquistossomose/pt). Acesso em: 02.11.2012.
- 1436

1437 **Fig. 6(A-F):** Eletromicrografias da morfologia externa e interna do verme macho de *S.*  
 1438 *mansoni*. **A, B e C:** Verme com 25 dias, 45 dias e 130 dias, respectivamente apresentando as  
 1439 mesmas estruturas externas como ventosa oral (seta curta), ventosa ventral (seta longa) e canal  
 1440 ginecóforo (seta aberta). Em destaque de cada eletromicrografia encontra-se a micrografia  
 1441 respectiva a cada idade do verme. **D-E:** Estruturas tegumentares e subtegumentares presentes  
 1442 no verme 25 dias, 45 dias e 130 dias - tegumento (T), espícula (Es), musculatura circular (mc),  
 1443 musculatura longitudinal (ml), bolsas subtegumentares (★), inclusões lipídicas (iL), células  
 subtegumentares (Cs), células digestivas (cd). **F:** Detalhe do tegumento com a presença da  
 superfície da membrana tegumentar (seta longa), corpos de inclusão (seta curta), corpos  
 membranosos (Δ), mitocôndria (m), bolsas tegumentares (\*). N=núcleo e Lu = lúmen  
 intestinal.



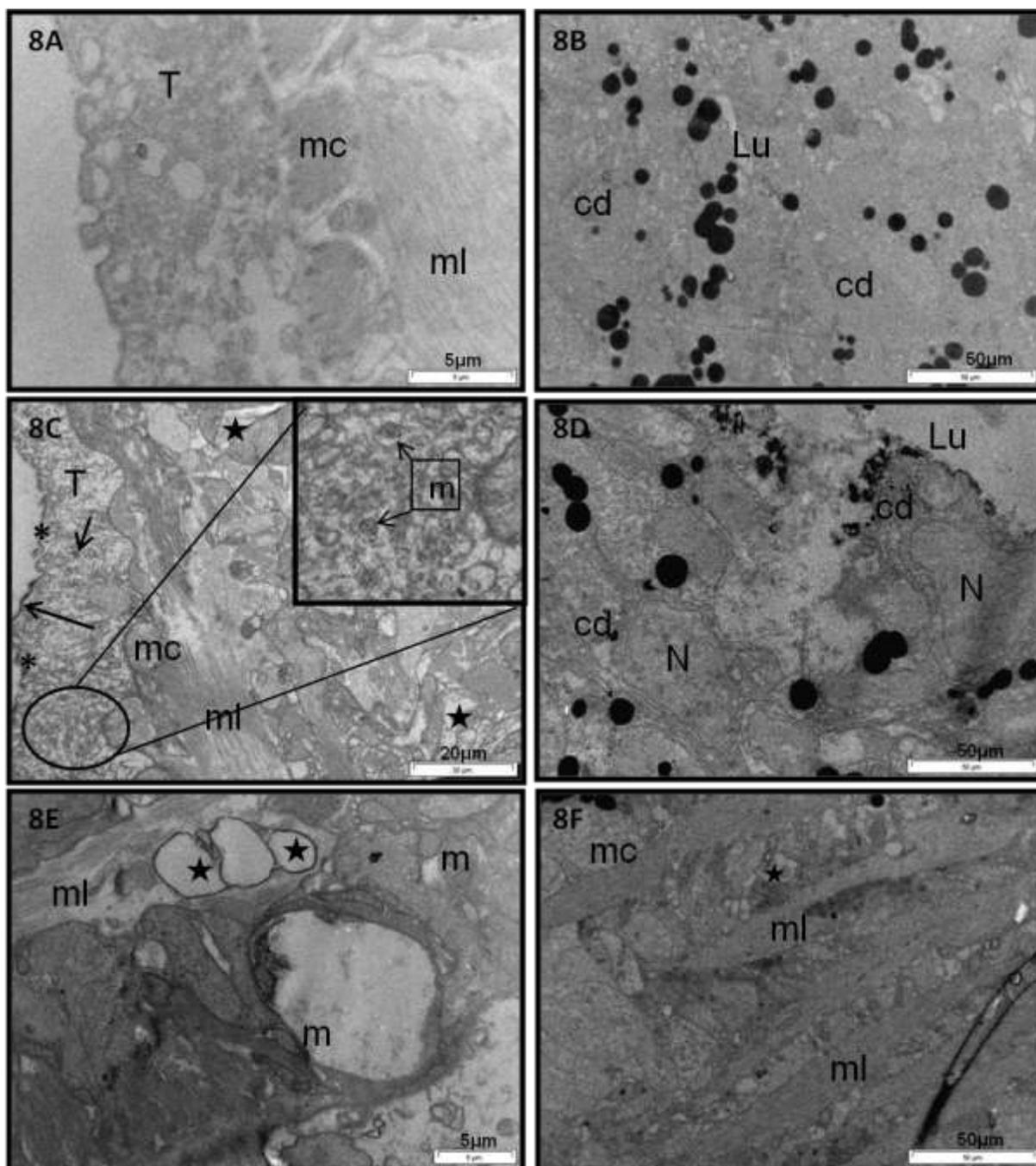
1444 **Fig. 7(A-D):** Eletromicrografias de vermes adultos de *S. mansoni* com 25 dias para localização  
1445 de sítios de cálcio. **A:** Grupo controle mostrando ausência de marcação em todas as estruturas  
1446 do tegumento (T), musculatura circular (mc) e musculatura longitudinal (ml). **B-D:** Podemos  
1447 observar a presença de sítios de cálcio através da eletrondensidade das estruturas - na  
1448 superfície da membrana tegumentar (setas longas), corpos de inclusão (seta curta), mitocôndria  
(m), bolsas tegumentares (\*), bolsas subtegumentares (★), musculatura circular (mc),  
1449 musculatura longitudinal (ml) e membranas (seta aberta) da célula subtegumentare (Cs). T =  
tegumento e N = Núcleo.



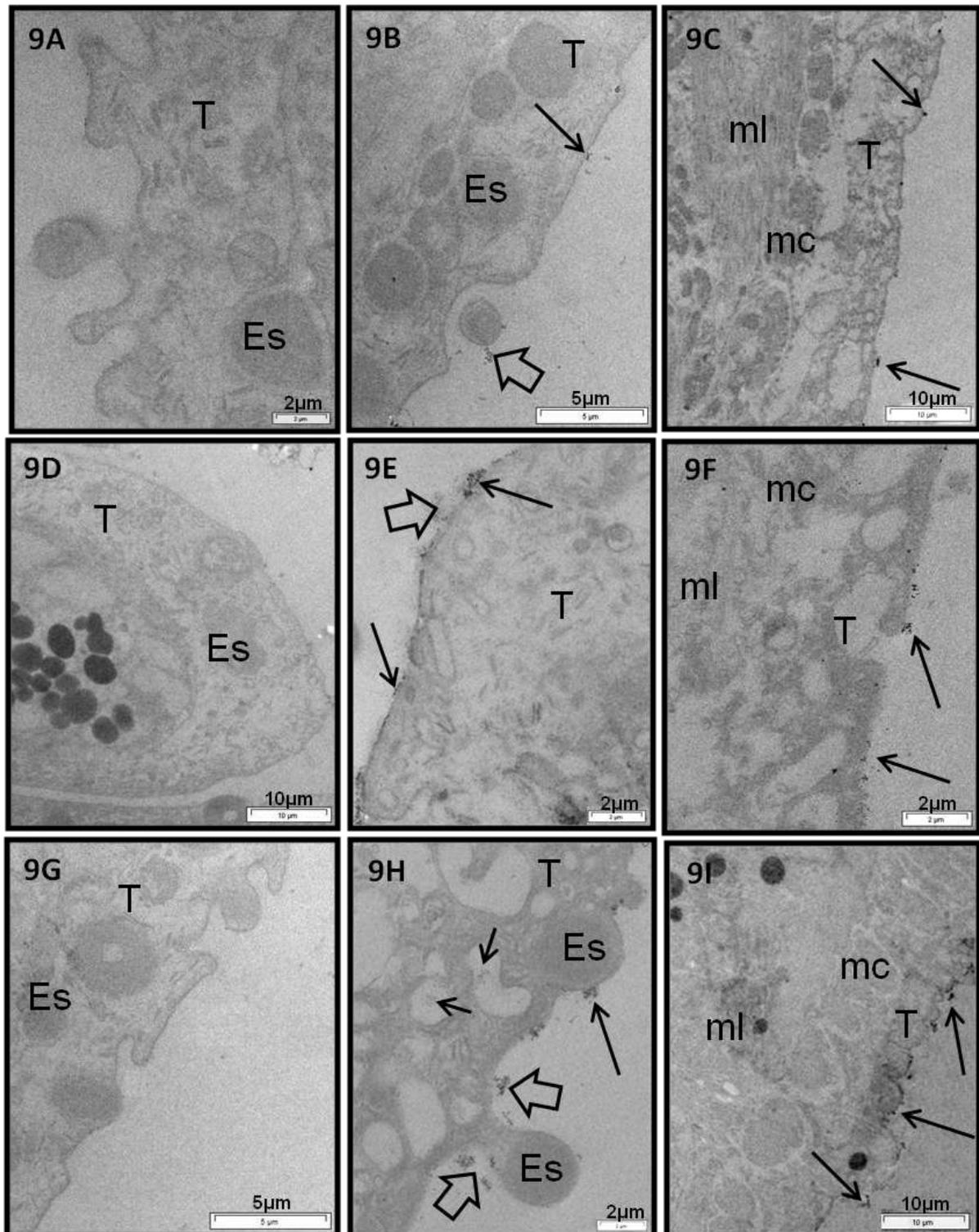
1450 **Fig. 8(A-F):** Eletromicrografias de vermes de *S. mansoni* com 45 dias (**A, C e E**) e 130 dias (**B, D e F**) para localização de sítios de cálcio. **A e B:** Grupo controle mostrando  
 1451 ausência de marcação em todas estruturas do tegumento (T), musculatura circular (mc),  
 musculatura longitudinal (ml) e células digestivas (cd). **C-F:** Podemos observar a  
 1452 presença de sítios de cálcio através da eletrondensidade das estruturas na superfície da  
 membrana tegumentar (setas longas), corpos de inclusão (seta curta), mitocôndria (m),  
 1453 bolsas tegumentares (\*), bolsas subtegumentares (★), musculatura circular (mc),  
 musculatura longitudinal (ml) e células digestivas (cd). T = tegumento, N=núcleo e Lu =  
 1454 lúmen intestinal.

1455

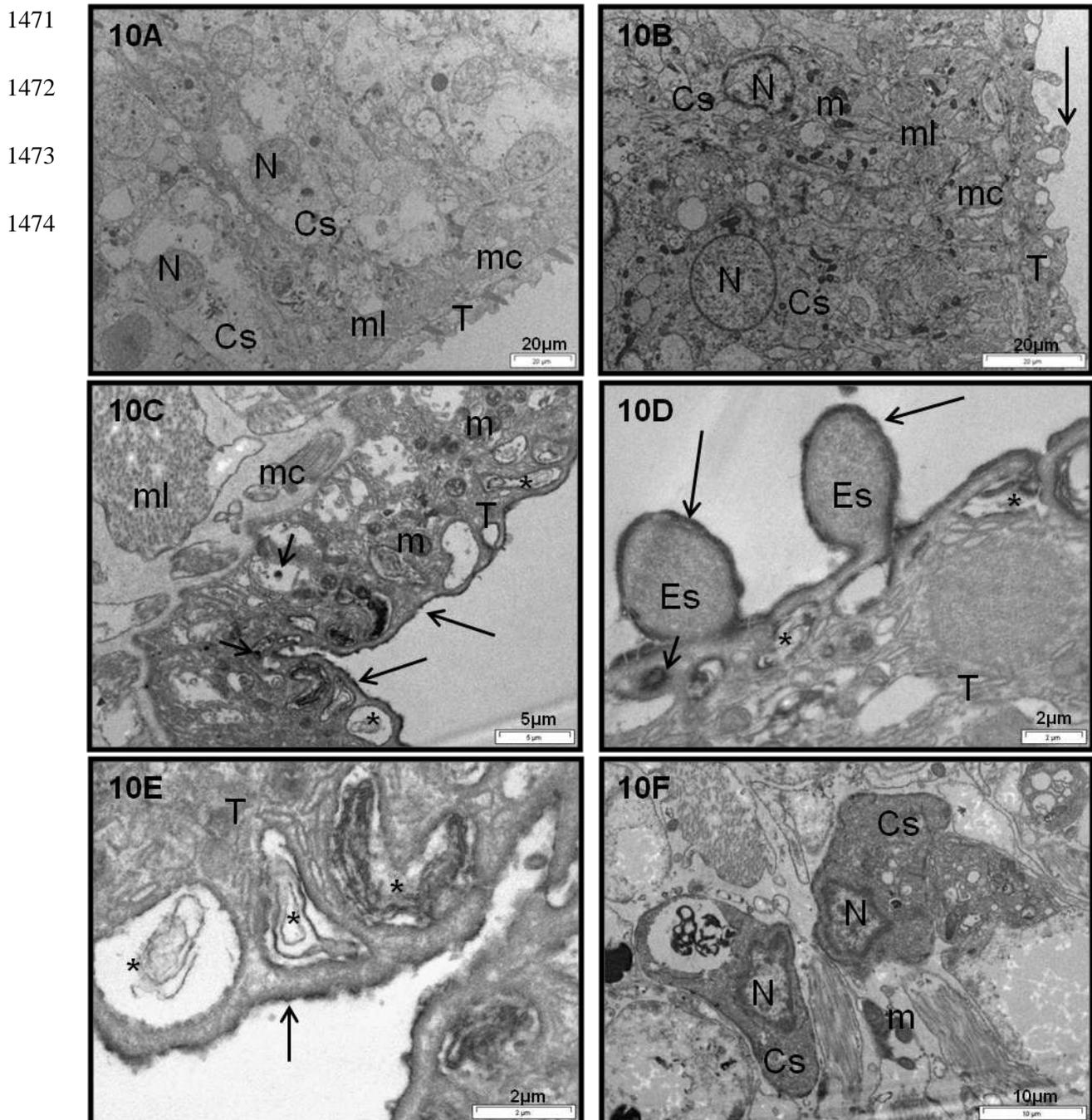
1456



1457 **Fig. 9 (A-I):** Eletromicrografias de vermes de *S. mansoni* com 25 dias (A e B), 45 dias (D e  
1458 E) e 130 dias (G e H) para identificação de carboidratos ácidos através da ferritina cationizada.  
1459 A, D e G: Grupos controle mostrando ausência de marcação em todas estruturas do tegumento  
1460 (T). B, E e H: Podemos observar marcação na superfície da membrana tegumentar (setas  
1461 longas) e glicocálice (setas abertas) e bolsas tegumentares (seta curta). Note que o perfil de  
marcação varia de acordo com a idade do verme. C, F e I: Vermes de *S. mansoni* com 45 dias  
submetidos ao tratamento enzimático com condroitinase, tripsina e neuraminidase, antes da  
incubação com a ferritina cationizada, respectivamente. Com marcação na superfície da  
membrana tegumentar (setas longas). T=tegumento, Es=Espícula, mc=musculatura circular,  
ml=musculatura longitudinal.

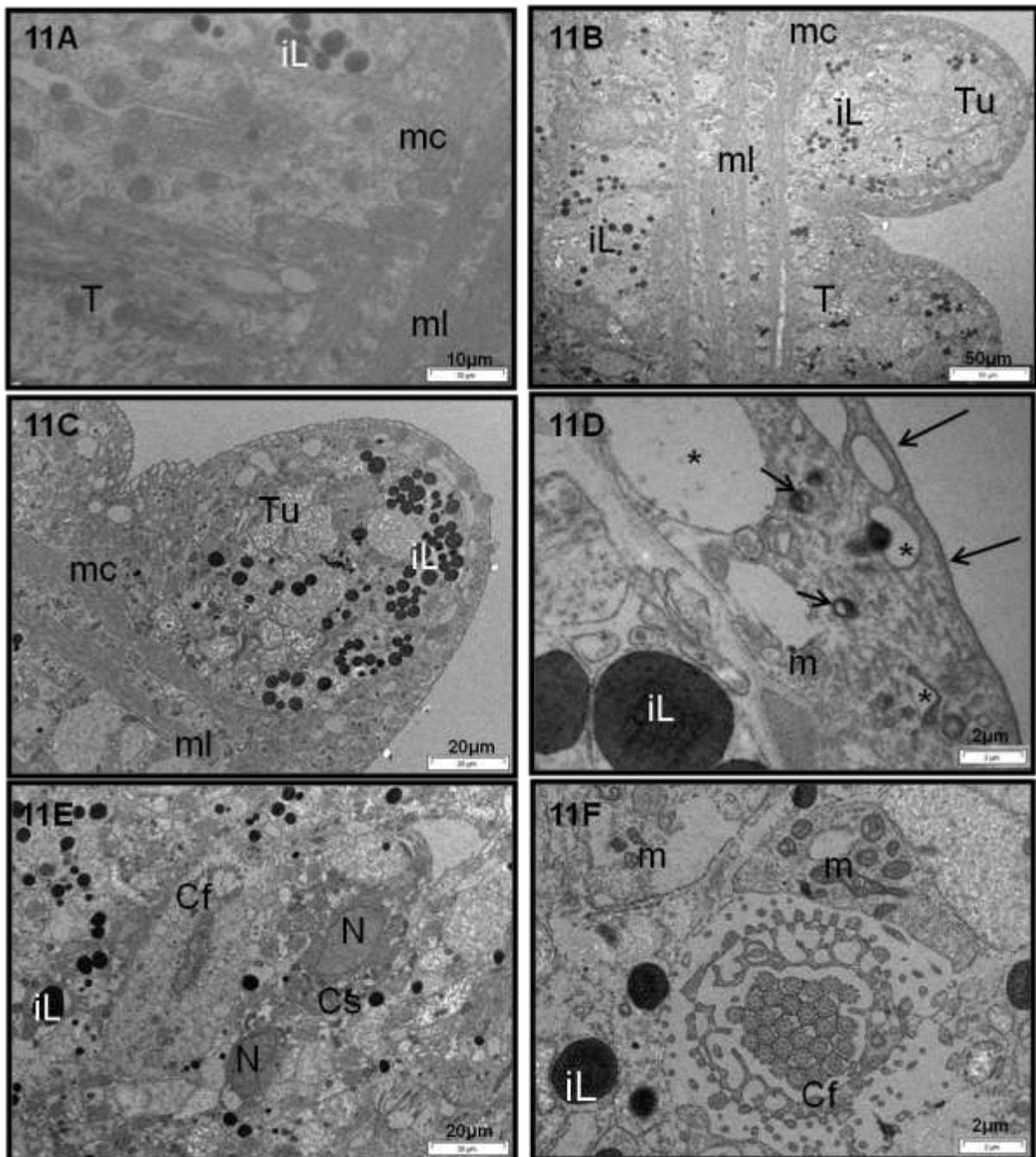


1466 **Figs. 10(A-F):** Eletromicrografias de vermes de *S. mansoni* 25 dias para localização de  
 1467 lipídios insaturados através do imidazol. **A:** Grupo controle mostrando ausência de  
 1468 marcação em todas as estruturas do tegumento (T), musculatura circular (mc), musculatura  
 1469 longitudinal (ml) e células subtegumentares (Cs). **B-F:** Podemos observar a presença de  
 1470 lipídios insaturados através da eletrondensidade das estruturas marcadas pelo imidazol na  
 1471 superfície da membrana tegumentar (setas longas), corpos de inclusão (seta curta),  
 1472 mitocôndria (m), bolsas tegumentares (\*), além das membranas celulares da musculatura  
 1473 circular (mc), musculatura longitudinal (ml) e células subtegumentares (Cs). T=tegumento,  
 1474 N=Núcleo e Es=Espícula.

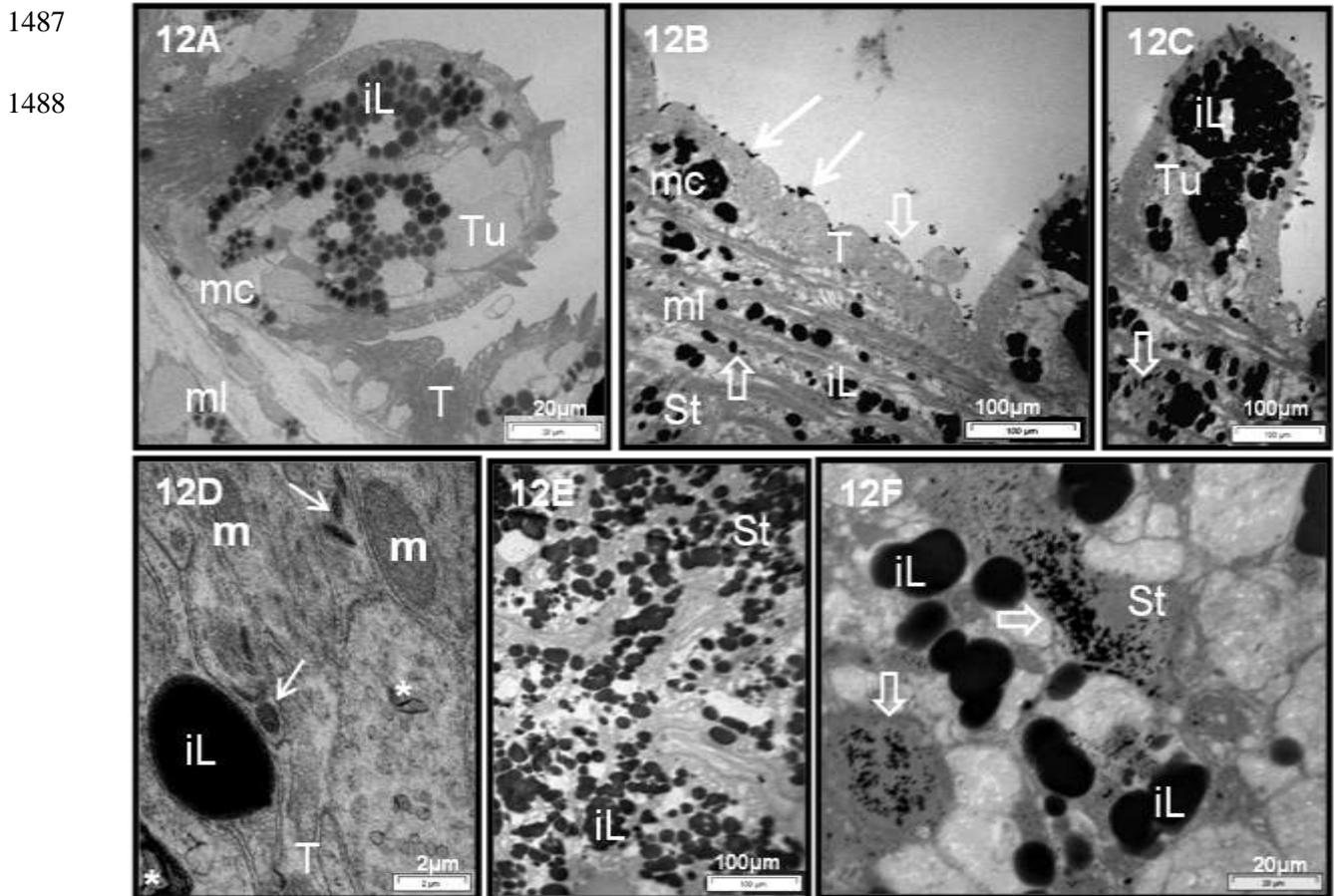


1475 **Figs. 11(A-F):** Eletromicrografias de vermes de *S. mansoni* com 45 dias para localização de  
 1476 lipídios insaturados através do imidazol. **A:** Grupo controle mostrando ausência de  
 1477 marcação em todas as estruturas do tegumento (T), musculatura circular (mc), musculatura  
 1478 longitudinal (ml). **B-F:** Podemos observar a presença de lipídios insaturados através da  
 1479 eletrondensidade das estruturas na superfície da membrana tegumentar (setas longas),  
 corpos de inclusão (seta curta), mitocôndria (m), bolsas tegumentares (\*), musculatura  
 circular (mc), musculatura longitudinal (ml) e células subtegumentares (Cs). T= tegumento,  
 Tu =Tubérculo, iL = Inclusão lipídica, Cf = Célula flame e N = Núcleo.

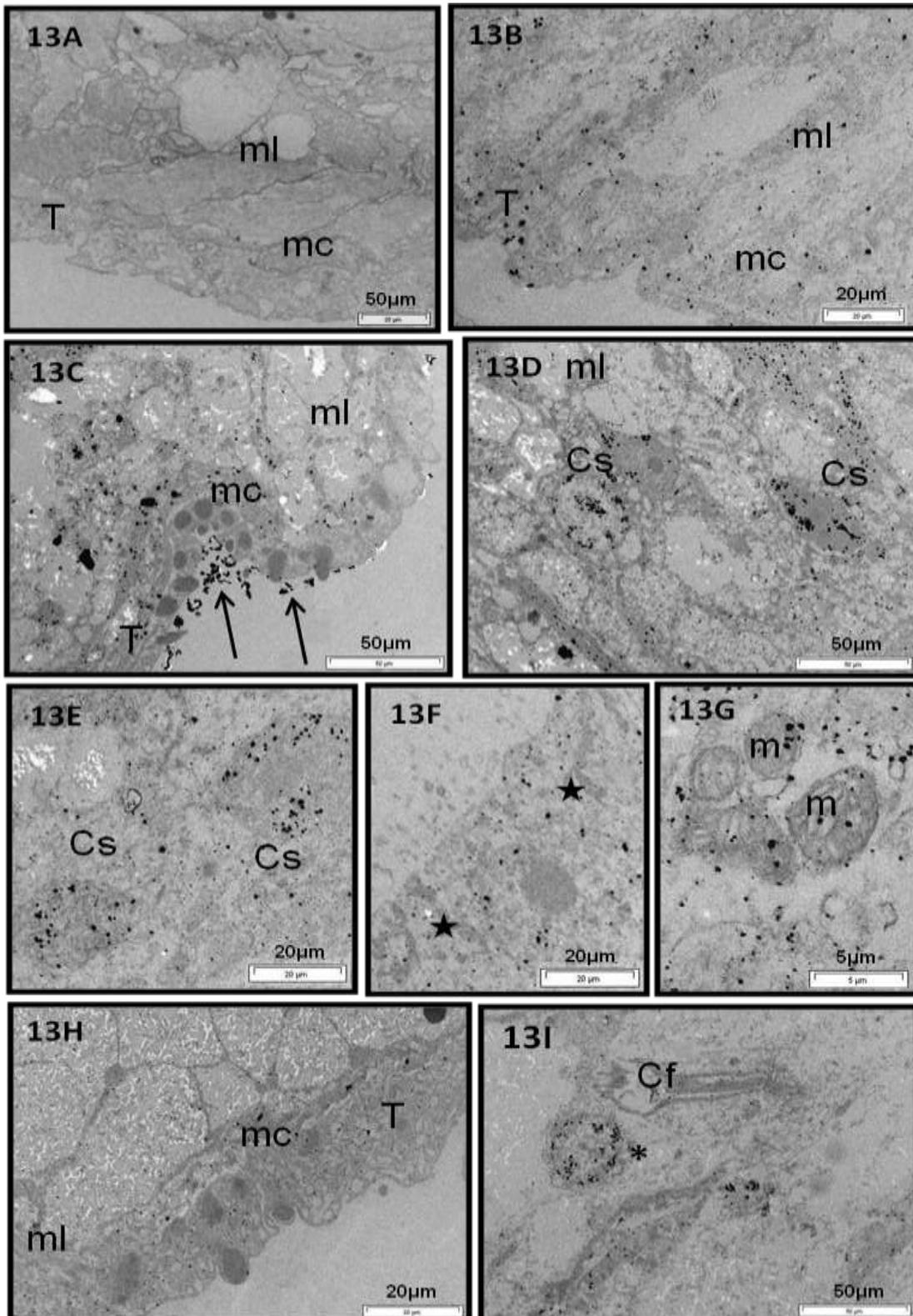
1480  
 1481



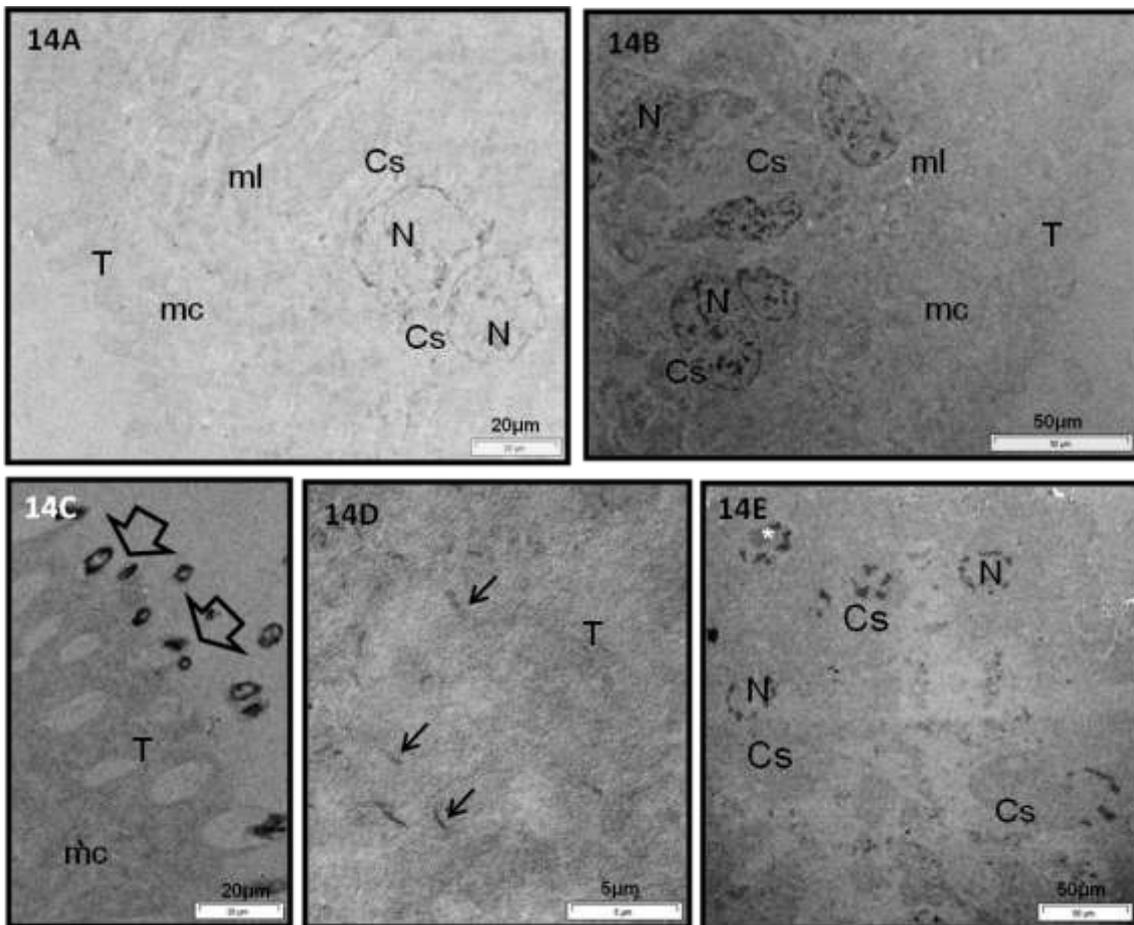
1482 **Figs. 12(A-E):** Eletromicrografias de vermes de *S. mansoni* com 130 dias para  
1483 localização de lipídios insaturados através do imidazol. **A:** Grupo controle mostrando  
1484 presença de inclusões lipídicas (iL) com menor eletrondensidade no interior do verme.  
1485 **B-F:** Podemos observar a presença destacada de lipídios insaturados superfície da  
1486 membrana tegumentar (setas longas), corpos de inclusão (seta curta), mitocôndria (m),  
bolsas tegumentares (\*), tubérculo (Tu), musculatura circular (mc) e musculatura  
longitudinal (ml). Note presença de pequenas partículas de lipídios no glicocálice, região  
tegumentar e subtegumentar (setas abertas). St = região subtegumentar e iL = Inclusão  
lipídica.



1489 **Figs. 13(A-I):** Eletromicrografias de vermes de *S. mansoni* – 25 dias (**B**), 45 dias (**C-G**) e 130  
 1490 dias (**H e I**) para identificação de proteínas básicas, através da prata amoniacal. **A:** Grupo  
 1491 controle mostrando ausência de marcação nas estruturas do tegumento (T), musculatura circular  
 1492 (mc) e musculatura longitudinal (ml). **B:** Observamos marcação no tegumento (T), musculatura  
 1493 circular (mc) musculatura longitudinal (ml). **C-G:** Podemos observar a presença de marcação em  
 1494 muitas regiões do verme – no glicocálice (seta longa), tegumento (T), musculatura circular (mc),  
 1495 musculatura longitudinal (ml), mitocôndria (m), núcleo das células subtegumentares (Cs) e  
 células do intestino (★). **H-I:** Observar pouca marcação no tegumento, musculatura circular (mc)  
 e musculatura longitudinal (ml) do verme, além do núcleo da célula secretora (\*). Cf = Célula  
 flama e Lu = Lúmen intestinal.



1496 **Figs. 14(A-E):** Eletromicrografias de vermes de *S. mansoni* – 25 dias (B), 45 dias (C)  
1497 e 130 dias (D e E) para identificação de proteínas básicas, através do Ácido  
1498 fosfotungstico. A: Grupo controle mostrando ausência de marcação nas estruturas do  
1499 tegumento (T), musculatura circular (mc) e musculatura longitudinal (ml). B:  
1500 Observamos ausência de marcação no tegumento (T), musculatura circular (mc) e  
1501 musculatura longitudinal (ml) e marcação nos núcleos (N) das células  
subtegumentares (Cs). C: presença de espículas (seta aberta) marcadas no tegumento  
(T). D: Marcação nos corpos densos (setas) no tegumento (T). E: Marcação nos  
núcleos (N) e nucléolo (\*) das células subtegumentares (Cs).



1502

1503

1504 **CONCLUSÕES**

1505 1º) A identificação dos sítios de cálcio na região tegumentar e subtegumentar  
1506 dos vermes de *S. mansoni*, sugerem seu importante papel na contração  
1507 muscular e permeabilidade das membranas.

1508

1509 2º) A observação da ferritina cationizada no glicocálice e na superfície da  
1510 membrana tegumentar dos vermes de *S. mansoni*, sugere que além da função  
1511 estrutural os carboidratos ácidos tem participação, no reconhecimento e  
1512 adesão celular, e que os grupamentos de sulfeto podem estar conferindo a  
1513 carga aniônica na superfície dos vermes.

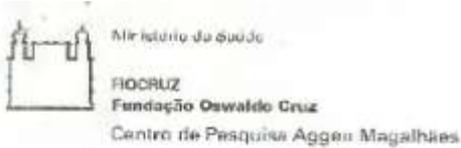
1514

1515 3º) A maior quantidade de lipídios insaturados foi observada nos vermes de *S.*  
1516 *mansoni* com 130 dias, comparado aos vermes com 25 e 45 dias.

1517

1518 4º) As proteínas básicas ricas em histidina no núcleo e nucléolo de células  
1519 subtegumentares (vermes de todas as idades) e no tegumento em especial  
1520 espinhos e corpos de inclusão, nos vermes de 45 e 130 dias, podem estar  
1521 envolvidas na diferenciação celular.

1522



## COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

### Certificado de Aprovação

Certificamos que o Projeto intitulado Ação de produtos naturais e do Praziquantel em Schistosoma mansoni e caracterização da resposta celular de Biomphalaria glabrata e Biomphalaria straminea. Protocolado sob o N° 06/2010, coordenado pelo (a) pesquisador (a) Luiz Carlos Alves de acordo com a Lei 11.794/2008 e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ Fundação Oswaldo Cruz (CEUA-CPqAM) em reunião 28/07/2011. Na presente versão, este projeto está licenciado e tem validade até dezembro de 2015

Quantitativo de Animais Aprovados	
Espécie	Nº de Animais
CAMUNDONGO MUS MUSCULUS SWISS WEBSTER IDADE 28 DIAS PESO 30 A 35g.	230
	TOTAL 230

We certify that the project entitled Ação de produtos naturais e do Praziquantel em Schistosoma mansoni e caracterização da resposta celular de Biomphalaria glabrata e Biomphalaria straminea (CEUA Protocol N° 06/2010), coordinated by Luiz Carlos Alves is according to the ethical principles in animal research adopted by the Brazilian law 11.794/2008 and so was approved by the Ethical Committee for Animal Research of the Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ Fundação Oswaldo Cruz on July 28, 2011. In the present version this project is licensed and valid until December, 2015

Recife (PE, Brazil) September 21, 2011.

  
**Dra Eridan de Medeiros Coutinho**  
 Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
 Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – FIOCRUZ