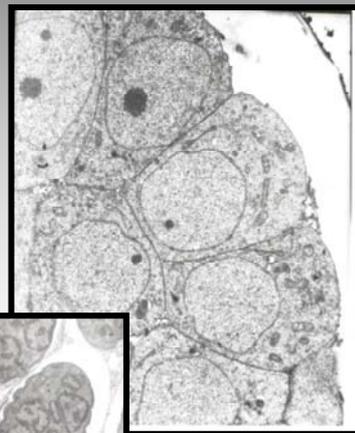
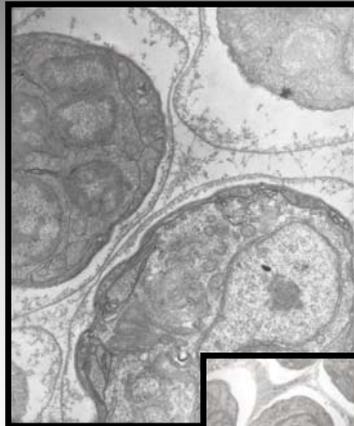


**Universidade Federal de Pernambuco**

*Centro de Ciências Biológicas*

*Departamento de Biofísica*

*Pós-Graduação em Biofísica e Radiologia*



**DESENVOLVIMENTO INTRA-UTERINO DA MICROFILÁRIA DE  
*Litomosoides chagasfilhoi* sp. nov. (NEMATODA: FILARIOIDEA)**



**RENATA MARIA COSTA SOUZA**

**Recife  
2003**

**RENATA MARIA COSTA SOUZA**

**DESENVOLVIMENTO INTRA-UTERINO DA MICROFILÁRIA DE  
*Litomosoides chagasfilhoi* sp. nov. (NEMATODA: FILARIOIDEA)**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Biofísica e Radiologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito final para obtenção do grau de Mestre.

**Orientadora:** Dra. Christina Alves Peixoto

RECIFE  
2003

**Souza, Renata Maria Costa**

**Desenvolvimento intra-uterino da microfilária de *Litomosoides chagasfilhoi* sp. nov. (Nematoda: Filarioidea) /  
Renata Maria Costa Souza . – Recife: O Autor, 2003.**

**67 folhas : il., fig.**

**Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de  
Pernambuco. CCB. Biofísica e Radiologia, 2006.**

**Inclui bibliografia.**

**1. Microfilária 2. Microscopia eletrônica 3. *Litomosoides chagasfilhoi* I. Título.**

**577.3 CDU (2.ed.)  
571.4 CDD (22.ed.)**

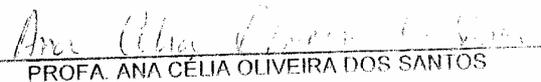
**UFPE  
CCB – 2007-005**

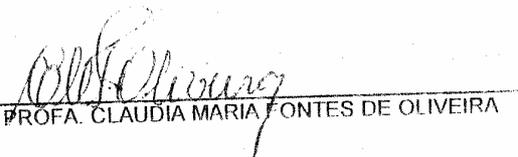


UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOFÍSICA E RADIOBIOLOGIA  
COORDENADORIA DE PÓS GRADUAÇÃO  
MESTRADO EM BIOFÍSICA

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DA ALUNA **RENATA MARIA COSTA SOUZA**, APRESENTADA, ÀS NOVE HORAS, NO ANFITEATRO 12 DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (CCB) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), NO DIA UM DE JULHO DE DOIS MIL E TRÊS, INTITULADA: "**DESENVOLVIMENTO INTRA-UTERINO DA MICROFILÁRIA DE *Litomosoides chaqasfilhoi* sp.nov. (NEMATODA: FILARIOIDEA)**" E ORIENTADA PELA PROFA. CHRISTINA ALVES PEIXOTO (CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES/FIOCRUZ). A BANCA EXAMINADORA CONSTITUÍDA PELAS PROFESSORAS DOUTORAS: HAIANA CHARIFKER SCHINDLER (CENTRO DE PESQUISA AGGEU MAGALHÃES/FIOCRUZ), NA QUALIDADE DE PRESIDENTE, ANA CÉLIA OLIVEIRA DOS SANTOS (INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS/UPE) E CLÁUDIA MARIA FONTES DE OLIVEIRA (CENTRO DE PESQUISA AGGEU MAGALHAES/FIOCRUZ). FOI APRESENTADA AOS PRESENTES PELA PROFA. MARIA TERESA JANSEM CATANHO (COORDENADORA DO MESTRADO EM BIOFÍSICA). A SEGUIR, A MESTRANDA EXPÔS SEU TRABALHO EM TEMPO HÁBIL. NA SEQUÊNCIA, AS EXAMINADORAS PROCEDERAM AS ARGUIÇÕES E O PARECER FINAL. O RESULTADO FOI O SEGUINTE: PROFA. HAIANA CHARIFKER SCHINDLER: APROVADA; PROFA. ANA CELIA OLIVEIRA DOS SANTOS: APROVADA; PROFA. CLAUDIA MARIA FONTES DE OLIVEIRA: APROVADA. DIANTE DAS MENÇÕES CITADAS E DE ACORDO COM O REGIMENTO DA PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOFÍSICA E A RES. 03/98 DO CCEPE A ALUNA FOI CONSIDERADA APROVADA, FAZENDO JUZ AO TÍTULO DE **MESTRE EM BIOFÍSICA**. NADA MAIS HAVENDO A REGISTRAR FIRMAM ESTE DOCUMENTO OS MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA. RECIFE, 01 DE JULHO DE 2003.

ASS:   
PROFA. HAIANA CHARIFKER SCHINDLER

ASS:   
PROFA. ANA CÉLIA OLIVEIRA DOS SANTOS

ASS:   
PROFA. CLAUDIA MARIA FONTES DE OLIVEIRA

*“Só existem dois dias no Ano que nada pode ser feito.  
Um se chama ONTEM e o outro AMANHÃ.  
Portanto HOJE é o dia certo para AMAR, ACREDITAR, FAZER e  
principalmente VIVER”.*

*Dalai Lama*

*"A coisa mais importante da VIDA,  
é saber o que é IMPORTANTE ... "*

*Dedico este trabalho às pessoas mais importantes  
da minha vida : Meu PAI, Minha MãE e Meu  
IRMÃO, que com um VERDADEIRO AMOR,  
tornou o meu caminho mais livre, mais limpo, mais  
digno. Só verdadeiro amor provoca alegria, porque  
é crescimento, realização, DOM de VIDA!*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar a oportunidade, o impulso e a chave. Por me ajudar a tornar visível o meu próprio mundo, mostrando-me que por mais longa e escura que seja a noite, o sol sempre volta a brilhar.

A minha família por TUDO. Tudo que sou, tudo que tenho, TUDO....

A minha orientadora, Christina Peixoto, a quem admiro pela sua sabedoria, competência e dedicação. Obrigada pela amizade, respeito, confiança e oportunidade, que muito contribuiu, tanto para a realização deste trabalho como para o meu crescimento pessoal. Minha eterna gratidão.

As Dras. Janaina Miranda e Regina Bressan, pela amizade, solidariedade, incentivo e colaboração na realização deste trabalho.

A Dra. Mônica Florêncio pelo apoio, incentivo e amizade.

A Dra. Haiana Schindler e Ana Célia pelo apoio e contribuição técnica

As Biólogas Fábria Cristina e Elizangela Dias, pelos momentos felizes no departamento, pelo carinho e amizade e pela contribuição técnica indispensável para a realização deste trabalho.

Ao técnico Raimundo Pimentel pela convivência, amizade, e sabedoria que muito colaborou para realização deste trabalho.

Aos técnicos Sérgio Santos e Rafael Guimarães (*in memoriam*) pela colaboração técnica.

A minha Prima Mayra pela amizade, palavras animadoras e de coragem que me deram forças para continuar.

A minha grande amiga Alice Araripe, por saber o verdadeiro sentido da palavra amizade.

A Kirte Teixeira, Edeneide Xavier e Lílian Montenegro, amigas e companheiras para todas as horas. Obrigada pela amizade, carinho, dedicação, contribuição e por me aceitar e entender do jeito que sou. Minha eterna amizade.

As minhas amigas Paulinha, Rosana e Janaina Melo, pela amizade e convívio saudável e alegre.

A minha Psicóloga Sonia Brito, pela grande ajuda nos momentos difíceis da minha vida.

Aos colegas do Departamento de Patologia e Biologia Celular do CPqAM: Andezza, Cleiton, Érika, Fábio, Fred, Graça, Karla, Lânia, Nicole, especialmente a Luiz e Fábio.

A Virginia Guimarães da Biblioteca do CPqAM, pela ajuda na obtenção das referências.

A Valéria, secretária do Mestrado em Biofísica e Radiologia (UFPE).  
Obrigada pelo apoio.

Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães- FIOCRUZ

A todos aqueles que de maneira direta ou indireta contribuíram para a  
realização deste trabalho.

**Muito Obrigada!!**

## ÍNDICE

<b>1. Revisão Bibliográfica</b>	02
1.1. Considerações Gerais	02
1.2. Características Biológicas do Parasita	04
1.2.1. Aparelho Reprodutor	04
1.2.1.1. Fertilização	05
1.2.2. Classificação taxonômica do agente etiológico de <i>Litomosoides chagasfilhoi</i>	06
1.2.3. Ciclo Evolutivo do Gênero <i>Litomosoides</i>	07
1.2.4. Microfilária	08
1.2.4.1. Cutícula	10
1.2.4.2. Bainha	12
1.2.4.3. Formação Intra-Uterina das Bainhas de Microfilárias	13
<b>2. Objetivos</b>	16
<b>3. Referência Bibliográfica</b>	18
<b>4. Artigo Científico</b>	28
Resumo	28
Abstract	29
Introdução	31
Materiais e Métodos	33
Resultados	36
Discussão	55
Conclusões	62
Referência Bibliográfica	63

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1** Esquema da anatomia do Aparelho reprodutivo da fêmea e do macho de filaria
- Figura 2** Esquema do ciclo de vida de *Litomosoides chagasfilhoi* no roedor
- Figura 3** Esquema da microfilária
- Figura 4** Cortes do Coração do Roedor Corados com H&E
- Figura 5** Cortes dos Rins do Roedor Corados com H&E
- Figura 6** Corte do Fígado do Roedor Corados com H&E
- Figura 7** Corte do Baço do Roedor Corados com H&E
- Figura 8** Cortes do Pulmão do Roedor Corados com H&E
- Figura 9** Corte longitudinal, do Ovário de *Litomosoides chagasfilhoi* corado com H&E e Tricrômio de Mallory
- Figura 10** Útero da fêmea de *Litomosoides chagasfilhoi*, corte longitudinal, corados com H&E
- Figura 11** Corte da Região Proximal do Útero corados com H&E
- Figura 12** Região Média do Útero - Embriões Apresentando forma de ferradura - "Pretzel", corados com H&E.
- Figura 13** Região Anterior do Útero, vagina e vulva, corados com H&E
- Figura 14** Cortes longitudinais ultrafinos da parede do útero das fêmeas de *Litomosoides chagasfilhoi*
- Figura 15** Cortes longitudinais ultrafinos de microfilárias intra-uterinas em diferentes estágios do desenvolvimento embrionário
- Figura 16** Cutícula da microfilária
- Figura 17** Embriões enrolados em forma de ferradura - Fase de Pretzel
- Figura 18** Cortes longitudinais ultrafinos de microfilárias intra-uterinas mortas
- Figura 19** Microfilárias com cascas ovulares maiores que elas, invaginações dobradas entre os embriões
- Figura 20** Cortes longitudinais ultrafinos de ovos, microfilárias intra-uterinas e microfilárias sanguíneas

## **1. Revisão Bibliográfica**

---

## 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1. Considerações Gerais

A filariose é uma infecção causada por parasitas nematóides pertencentes à superfamília Filarioidea, que são encontrados parasitando homens e animais (Pessoa, 1967; Anderson & Bain, 1976; Sasa 1976). Oito são as espécies de grande importância médica por fazerem parte de um grupo de parasitas que podem infectar o homem, tornando-o hospedeiro definitivo: *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi*, *Brugia timori* (espécies de localização linfática); *Onchocerca volvulus* (localização subcutânea); *Loa loa* (localização em tecido subcutâneo e conjuntivo); *Mansonella ozzardi* (localizado na cavidade do corpo); *Mansonella perstans* (localizados na cavidade abdominal e pleural, tecidos retroperitoneal e perirenal) e *Mansonella streptocerca* (localização na derme principalmente próximo a epiderme) (Anderson,1992). Esses parasitas ameaçam à saúde e o bem estar da humanidade devido à redução da produtividade ou mesmo a incapacitação para o trabalho prejudicando assim, o desenvolvimento econômico.

Nos últimos anos foi registrado um aumento crescente no número de casos da filariose linfática humana em várias áreas do mundo, despertando o interesse das autoridades sanitárias internacionais para esse problema (WHO,1994; Michael *et al.*, 1996; Rajan & Gundlapalli, 1997; Ottesen *et al.*, 1997).

Das três espécies de filariose linfática humana que atingem aproximadamente 120 milhões de pessoas em diversos países, a *Wuchereria bancrofti* é a espécie mais amplamente distribuída no mundo, sendo responsável por 90% de todos os casos (WHO, 2002). A Índia apresenta a maior prevalência, onde são notificados cerca de 43% dos casos (Michael *et al.*, 1996).

No Brasil, a bancroftose é um importante problema de saúde pública, particularmente na região metropolitana do Recife (Medeiros *et al.*, 1992;

WHO, 1992; Maciel, *et al.*, 1996), tanto pelo número de casos notificados (MS, 1990) como pela morbidade associada ao dano linfático (Dreyer *et al.* 1996; Norões *et al.*, 1996). No entanto, existem poucos estudos relacionados aos vermes adultos por ser o homem o único hospedeiro definitivo (Buck, 1991).

A falta de modelo experimental e a impossibilidade de se cultivar *in vitro* essa espécie de filarídeo (Galliard & Chabaud, 1953; Bain *et al.*, 1985; Morgan *et al.*, 1986; Zi-da, 1986; Araújo *et al.*, 1995), implica diretamente na falta de conhecimentos em relação a importantes aspectos como: a determinação da idade da infecção; o número de filarídeos adultos presentes; o número de infecções sofridas pelo hospedeiro e a presença de infecções prévias ou intercorrentes com outros helmintos, impedindo sobretudo um conhecimento mais apurado da resposta imunológica específica.

Por outro lado, filarídeos parasitas de animais que apresentam analogias quanto a estrutura e a biologia das espécies hospedeiras do homem, podem ser utilizados para um melhor conhecimento das endemias causadas pelas espécies que acometem o ser humano. Algumas espécies da família Onchocercidae foram descritas parasitando naturalmente roedores e são utilizadas como modelos experimentais, como a *Litomosoides sigmodontis* Chandler, 1931 que tem sido usada extensivamente em estudos anti-helmínticos, na imunologia e na bioquímica desde a descoberta dos detalhes de sua transmissão e desenvolvimento (Anderson, 2000).

As espécies do gênero de *Litomosoides* são encontradas na cavidade do corpo de roedores, morcegos e marsupiais. As microfilárias apresentam bainhas que recobrem todo o seu corpo e são encontradas no sangue do hospedeiro (Anderson, 2000, Moraes Neto, 1997a). No Brasil, são relatadas a presença de algumas espécies que parasitam roedores (Moraes Neto, 1997a).

Recentemente foi descrita uma nova espécie, a qual foi chamada de *Litomosoides chagasfilhoi* sp. nov. em homenagem ao Prof. Carlos Chagas Filho no 50<sup>th</sup> aniversário do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Essa espécie ocorre na cavidade torácica e abdominal de roedores *Akodon cursor* provenientes de Rio Bonito, Estado do Rio de Janeiro. O *L. sigmodontis*, *L. galizai* e *L. silvai* apresentam parentesco próximo a esta nova espécie, diferindo apenas em certos aspectos morfológicos (Moraes Neto, 1997a, 1997b).

## 1.2. Características Biológicas do Parasita

Ambos os sexos de *L. chagasfilhoi* sp. nov., apresentam corpo branco, longo, delgado e cilíndrico, ligeiramente afilado nas extremidades.

A extremidade cefálica é arredondada e tem uma abertura oral simples, sem lábios, limitados por uma borda espessa. Essa abertura é ligeiramente deslocada da linha central do corpo. Apresentam ainda, anel nervoso situado na extremidade anterior.

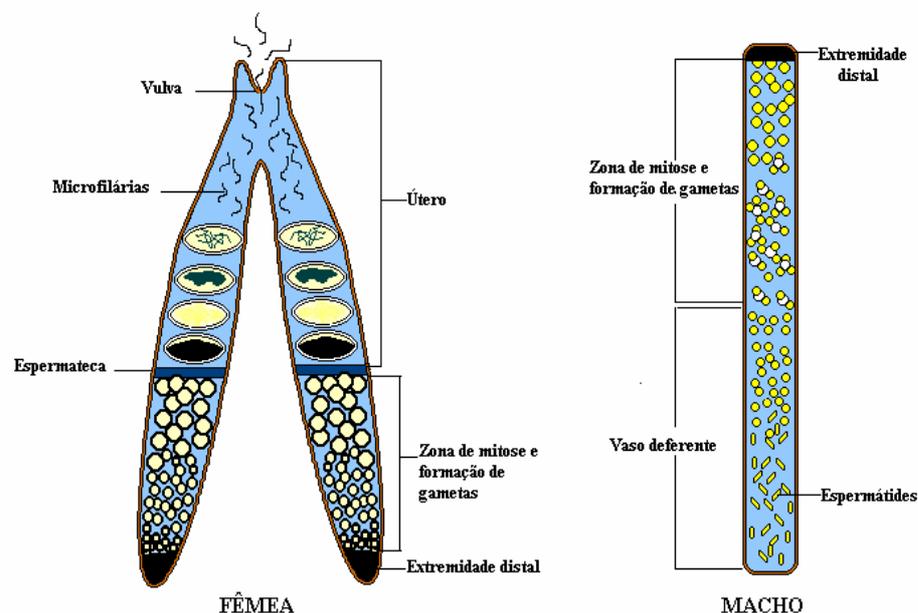
O macho mede aproximadamente 2,19 a 3 cm de comprimento e 142 a 155,8  $\mu\text{m}$  de diâmetro, a fêmea mede entre 8,7 a 9,50 cm de comprimento por 304 a 345  $\mu\text{m}$  de diâmetro, o embrião (microfilária) mede aproximadamente 100  $\mu\text{m}$  de comprimento por 5,0  $\mu\text{m}$  de diâmetro (Moraes Neto, 1997a).

### 1.2.1. Aparelho Reprodutor

De acordo com Scott (2000), os filarídeos machos apresentam apenas um testículo que se origina perto da junção esôfago-intestino e se estende ao longo de todo o verme. As células de todos os estágios da espermatogênese estão localizadas dentro do testículo. Este apresenta uma zona distal onde são formadas as células germinativas, uma outra zona onde ocorre a maturação, e um reservatório de espermatozoides imaturos denominado de vesícula seminal e/ou vasos deferentes. Observa-se ainda uma região muscular ao redor de um ducto ejaculatório especializado que se abre dentro da cloaca. A extremidade posterior mostra uma estrutura enrolada quatro vezes e na última volta é observada a abertura cloacal, onde duas espículas emergem. Esta abertura possui um par de papilas adcloacais, quatro a seis pares de papilas postcloacais, e uma única papila próxima a parte final (cauda) (Moraes Neto, 1997a). A função das espículas é auxiliar o macho no momento da cópula dilatando a vulva e a vagina da fêmea (Fig. 1).

Ainda segundo Scott (2000), o aparelho reprodutor das fêmeas apresenta duas ramificações idênticas enroladas dentro da cavidade do corpo

para acomodar seu comprimento que é aproximadamente 1,5 vezes maior que o próprio corpo. Os dois ramos do sistema reprodutivo formam um ducto comum próximo à vulva, que por sua vez, está localizada na superfície ventral na região anterior. Cada ramificação do gonoducto apresenta uma zona proximal, semelhante a um ovário, onde ocorrem a formação das células germinativas e a maturação dos ovos, e uma zona semelhante a um útero onde o embrião se desenvolve. No ponto onde as duas zonas se unem, o epitélio modifica-se para estocar espermatozóides após a cópula, sendo esta estrutura denominada espermateca (Fig. 1).



**Fig 1.** Esquema da anatomia do Aparelho reprodutivo da fêmea e do macho de filária (adaptado de Scoot, 2000)

### 1.2.1.1 Fertilização

Os gametas femininos são desenvolvidos na extremidade posterior do ovário. As oogônias contêm um núcleo grande, ribossomos, pequenas mitocôndrias e alguns complexos de Golgi, sofrem rápidas divisões

mitóticas que são raramente observadas. Estão fixas a um raque até se tornarem oócitos primários maduros (McLaren, 1973). Os oócitos primários são vistos como células alongadas possuindo núcleo grande com um a dois nucléolos. Possuem numerosas organelas e uma membrana nuclear bem definida. O oócito secundário é um pequeno corpo arredondado, o núcleo possui uma membrana mal definida que contém líquido claro com um a dois nucléolos. Os oócitos fertilizados dividem-se por meiose. A fertilização ocorre quando o gameta masculino penetra no óvulo da fêmea, a união de gametas acontece próximo ao pólo do raque. Poli-esperma às vezes acontece durante a fertilização, mas só um gameta masculino tem sucesso, os outros se desintegram antes de alcançar o pronúcleo da fêmea (Taylor, 1960).

### **1.2.2. Classificação Taxonômica do Agente Etiológico de *Litomosoides chagasfilhoi* (Moraes Neto, 1997a)**

Reino:	Animalia
Filo:	Nematoda
Classe:	Phasmidia
Subclasse:	Secernentea
Ordem:	Spirurida
Subordem:	Spirurina
Superfamília:	Filarioidea
Família:	Onchoncercidae
Subfamília:	Onchocercinae
Gênero:	<i>Litomosoides</i>
Espécie:	<i>Litomosoides chagasfilhoi</i>

### 1.2.3. Ciclo Evolutivo do Gênero *Litomosoides*

O conhecimento completo do ciclo evolutivo dos filarídeos em geral, só foi possível através de pesquisas em laboratório com *Litomosoides carinii* (Scott, *et al.*, 1951).

As larvas apresentam cinco estágios (L1, L2, L3, L4 e L5) até chegar à fase adulta, típico de outros grupos de nematóides. Os três primeiros estágios ocorrem no hospedeiro intermediário, o último estágio e os vermes adultos são encontrados na cavidade geral do corpo do hospedeiro definitivo. As microfilárias se desenvolvem no útero das fêmeas presentes no hospedeiro definitivo. (Anderson, 2000; Scott, *et al.*, 1951).

O ciclo parasitário dos filarídeos inclui necessariamente um hospedeiro intermediário que no caso do gênero *Litomosoides* são diminutos artrópodes da ordem Acarina conhecidos como ácaros. Estes ao exercerem a hematofagia em um animal que apresente microfilaremia, ingerem as microfilárias. Estas em poucas horas atravessam a parede do intestino do ácaro, perdem a bainha, e caem na hemocele onde ocorrem as três fases de desenvolvimento (L1, L2 e L3). Quando as larvas alcançam o terceiro estágio, infectante (L3), migram para a cabeça do ácaro, localizando-se nas estruturas de alimentação que irão mediar a transmissão para o hospedeiro definitivo (Williams and Brown, 1945, 1946).

O ciclo parasitário nos vertebrados inicia-se no momento em que ácaros, infectados com larvas infectantes (L3), sugam o sangue dos roedores e as larvas que caem sobre a pele do animal migram para o sistema linfático. Estas deixam o sistema linfático e vão para o sistema venoso, passando pelo coração, pulmão e, alojando-se na cavidade pleural.

Nos roedores, as larvas infectantes sofrem mais duas mudas até atingirem à forma adulta. No momento que a maturidade sexual é alcançada, machos e fêmeas copulam e dão origem às microfilárias, estas por sua vez migram para a corrente sangüínea do hospedeiro definitivo (Wenk, 1967; Hoffmeister and Wenk, 1991) (Fig. 2).

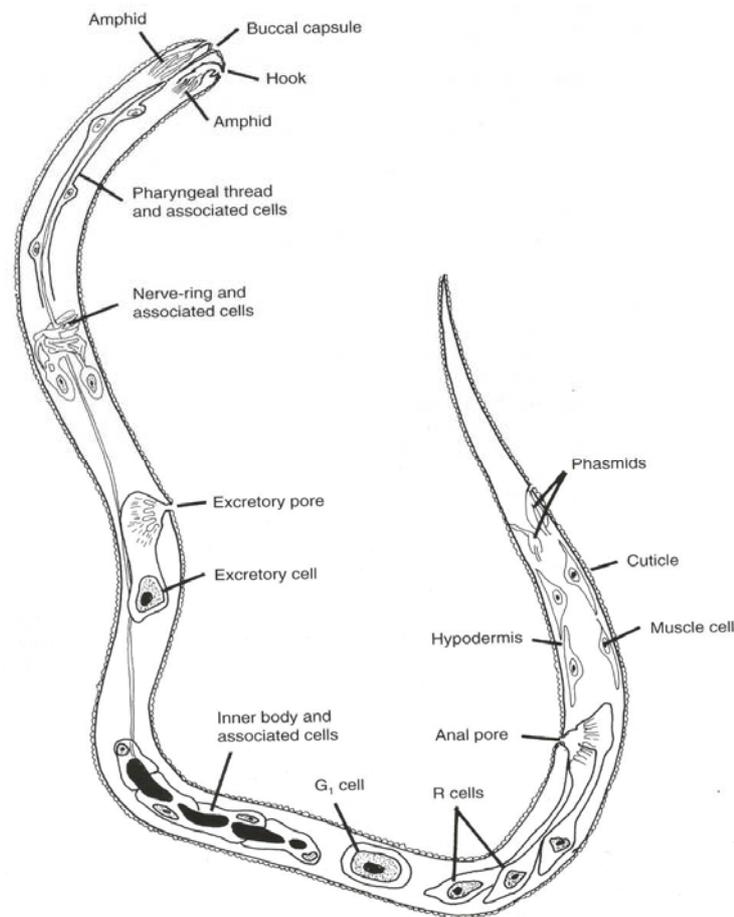


cutícula. As células musculares são compridas e possuem forma afilada. O esôfago (faringe) é um tubo longo e estreito que se estende da cavidade bucal até a região anterior do corpo interno. O corpo interno possui uma estrutura em forma de saco contendo grânulos densos e esféricos. Parece ser uma reserva de alimento que pode ser abastecida através da abertura oral e do tubo esofágico (Anderson, 2000). O sistema excretório consiste em uma vesícula que se abre para o exterior através de um poro na cutícula e uma grande célula que é conectada à vesícula por uma ponte citoplasmática (Tongu, 1974). A função precisa deste sistema ainda é obscura (Kosek, 1971; McLaren, 1972).

A célula G1 é a maior célula da microfilária, está situada próxima ao corpo interno e não mostra nenhuma característica incomum, contém um grande núcleo, ribossomos livres, grânulos de glicogênio, mitocôndria esférica, corpos de Golgi e retículo endoplasmático liso. As células R2-R4 estão conectadas à vesícula anal. Possuem um núcleo grande com nucléolo distinto no centro, mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso e às vezes vários vacúolos (Tongu, 1974).

Kanagasuntheram *et al.* (1974 a,b) sugeriram um papel sensorial para a célula excretora e as células R2-R4, e um papel motor para a célula G1. Parece claro que as células R2-R4 estão eventualmente envolvidas na formação do reto durante o desenvolvimento no hospedeiro intermediário (Anderson, 2000). Bain (1970) e Petit (1981) concluíram que a célula G1 forma a musculatura do nematóide adulto, mas McLaren (1972) considerou esta hipótese duvidosa.

O aparelho anal, em algumas espécies é uma vesícula com forma de pera e, em outras é pequena e estreita. Abre-se para o exterior através de um poro da cutícula externa. A vesícula normalmente está cheia com material granular. A base do aparelho anal é cercada e conectada pelas três células retais (R2, R3, R4) (McLaren, 1972) (Fig. 3).



**Fig 3.** Esquema da microfilária (Anderson, 2000)

#### 1.2.4.1 Cutícula

Os nematóides são revestidos por uma estrutura altamente complexa, formada por multi-camadas que resulta da junção de componentes secretados pelas células hipodérmicas, chamada de cutícula (Wright, 1987). Nos estádios larvais a síntese desses componentes cuticulares, basicamente colágenos, cuticulinas, glicoproteínas e lipídeos, é realizado por estas células (Cox *et al.*, 1981a, b; Philipp & Rumjaneck, 1984; Wright, 1987; Bestchart & Wyss, 1990; Cox *et al.*, 1990; Proudfoot *et al.*, 1990, 1991; Sebastiano *et al.*, 1991; Selkirk, 1991; Cox, 1992; Politz & Philipp, 1992).

Devido às divergências sobre a definição da estrutura mais externa da cutícula como sendo uma membrana biológica, Wright (1987) propôs o termo epicutícula para a estrutura trilaminar. Essa estrutura apresenta variações de acordo com a espécie, estágio de desenvolvimento e região do corpo do nematóide estudada (Wright 1987; Bird and Bird 1991; Martinez and De Souza 1997). Sua matriz é composta principalmente de colágeno, cuticulina, algumas proteínas insolúveis e lipídeos (Moraes Neto *et al.*, 2001). Peixoto e De Souza (1996) sugeriram que a epicutícula dos nematóides é uma estrutura que apresenta uma especialização extrema da estrutura básica de uma membrana.

A cutícula recobre todo o organismo do nematóide exceto as pequenas aberturas, como faringe, ânus, poros sensoriais, secretórios e reprodutivos, e apresenta grande interesse por ser a estrutura que faz a interface com o hospedeiro através da epicutícula, sendo esta potencialmente importante para nutrição do parasita e proteção contra o ataque imunológico. A variação antigênica e o revestimento de antígenos do próprio hospedeiro são alguns dos vários mecanismos que os parasitas utilizam para escapar dos ataques do sistema imunológico do hospedeiro mamífero, e assim garantir a sua sobrevivência (Bird, 1980; Bird & Bird, 1991).

Os componentes estruturais que constituem a cutícula de vermes adultos de *L. chagasfilhoi* são: **a)** uma epicutícula trilaminar, camada mais externa que faz a interface com o hospedeiro; **b)** uma camada cortical, formada por uma rede de partículas globulares e fibras; **c)** uma camada intermediária, constituída por uma rede de fibras com orientação longitudinal; **d)** camada fibrosa, mais espessa, eletrodensa que consiste de fibras grossas e finas e; **e)** uma camada basal mais interna, intimamente associada com a hipoderme (Moraes Neto *et al.*, 2002).

A cutícula das microfilárias embainhadas ou desembainhadas, encontradas no útero ou no sangue, aparentemente são similares (McLaren, 1972). Segundo McLaren, a cutícula é uma estrutura simples comparada com os estágios larvais subseqüentes e vermes adultos. Basicamente ela é composta de uma camada fibrosa interna, uma camada cortical densa e uma membrana trilaminar externa.

Em *L. chagasfilhoi*, a cutícula das microfilárias apresenta duas regiões distintas: uma externa, que corresponde a epicutícula e uma interna, que corresponde a cutícula propriamente dita. A epicutícula trilaminar e a região cortical são formadas por uma rede de elementos globulares que dão a esta estrutura uma certa rigidez compatível com a suposição que a cutícula é uma matriz extra-celular (Moraes-Neto 2001).

#### 1.2.4.2 Bainha

Além da cutícula, as microfilárias de algumas espécies, como no caso do gênero *Litomosoides*, apresentam uma bainha frouxa que circunda todo seu corpo e são conhecidas como "microfilárias embainhadas", para distinguir de outras microfilárias em que a membrana ovular é perdida antes do embrião ser liberado no hospedeiro definitivo. Estas últimas são conhecidas como "microfilárias desembainhadas", como no caso de *Mansonella ozzardi* (Rey, 1991). Nas microfilárias embainhadas, a bainha representa a maior área de interação entre o parasita e o hospedeiro.

Estudos da superfície dos parasitas, como identificação e caracterização de suas proteínas, são relevantes para um melhor entendimento esta complexa estrutura e sua função. A composição antigênica da bainha tem importância em inúmeros fenômenos envolvendo a superfície da microfilária. Os antígenos de superfície são o principal alvo de interesse visto que o reconhecimento destas moléculas pelo sistema imune do hospedeiro pode contribuir para o desenvolvimento de uma resposta imune efetora (Proudfoot *et al.* 1991).

Moraes Neto *et al.* (2001) descreveram a bainha de *L. chagasfilhoi*, utilizando a microscopia eletrônica de transmissão (MET) e réplicas de criofatura "deep-etched". A MET demonstrou que a bainha é trilaminar, possuindo uma camada interna que permanece em contato com o espaço ao redor da epicutícula, uma camada intermediária que mostrou-se eletro-luscente e uma camada externa, homogênea e densa. Em réplicas de criofatura "deep-etched" a bainha apresentou duas camadas: uma camada interna composta de

um material globular firmemente organizado e uma camada externa cuja superfície é relativamente lisa.

Apesar dos inúmeros estudos sobre a presença dos componentes estruturais que constituem a bainha das microfilárias, estes ainda não foram completamente identificados. Algumas lectinas têm sido utilizadas para caracterizar os polissacarídeos na superfície de helmintos. Esse grupo de proteínas e/ou glicoproteínas ligam-se especificamente a seus polissacarídeos, sendo assim, bastante utilizadas para identificar a presença de carboidratos na superfície celular (Nicolson, 1974).

Através da utilização da lectina do germe do trigo (Wheat Germ Agglutinin – WGA), resíduos de N-acetilglicosamina têm sido identificadas na bainha de microfilárias de *B. pahangi* (Furman & Ash, 1983a, b; Devaney, 1985), *B. malayi* (Kaushal *et al.*, 1984), *W. bancrofti* e *L. carinii*.

Pesquisas sobre a estrutura da bainha das microfilárias de *W. bancrofti* com partículas policatiônicas de ferritina demonstraram a presença de proteínas ou glicoproteínas negativamente carregadas em sua superfície. Por sua vez, tratamentos enzimáticos com tripsina e neuramidase não interferiram na marcação das bainhas das microfilárias pela ferritina cationizada, indicando que o ácido siálico não é parte essencial na sua composição estrutural (De Souza *et al.*, 1989a).

#### **1.2.4.3 Formação Intra-Uterina das Bainhas de Microfilárias**

Devido à relevância da bainha das microfilárias na interação parasita/hospedeiro, alguns estudos têm sido realizados sobre a formação intra-uterina desta estrutura.

Em *Brugia malayi* (Rogers *et al.* 1976) e *Litomosoides carinii* (Scharaemeyer *et al.* 1987) a região eletrodensa e granular da bainha consiste de uma secreção do útero da filária. Rogers *et al.* (1976) sugeriram que este material, secretado pelas células apócrinas do útero, consiste de nutrientes para os embriões e que em determinado momento da diferenciação, as cascas

ovulares ficariam tão próximas que formariam canais entre os embriões adjacentes permitindo a passagem desses nutrientes.

Análises comparativas sobre a ultraestrutura da casca do ovo e da bainha de *B. pahangi* foram realizadas por Zaman (1987). Este autor descreveu a presença de projeções eletrodensas tanto na superfície da casca ovular, como sobre a bainha de microfilárias sanguíneas. Diante disso o autor sugere que a bainha de microfilárias é originada da casca ovular.

Segundo Zaman (1987), a casca do ovo é formada por duas estruturas: uma membrana homogênea e, projeções eletrodensas que repousam sobre a membrana, recobrando toda a superfície da casca do ovo. As projeções variam em forma e tamanho e são encontradas, também, na bainha das microfilárias. O autor ressalta a possibilidade das projeções serem formadas por material quitinoso que poderiam agir como uma barreira química ou mecânica frente à imunidade humoral e celular do hospedeiro, uma vez que essas projeções são constituídas por um material bastante resistente.

Devido a importância da casca do ovo e da bainha das microfilárias na resposta do sistema imune do hospedeiro aos filarídeos, existem vários estudos sobre essas estruturas em várias espécies. No entanto, o conhecimento da espécie *Litomosoides chagasfilhoi*, recentemente descrita, é limitado e, portanto existe a necessidade de estudos morfológicos e bioquímicos para que se possa utilizá-la como modelo experimental em analogia às espécies parasitas do homem. No presente estudo analisamos o desenvolvimento intra-uterino dos embriões de *Litomosoides chagasfilhoi* desde a fertilização até o nascimento, como também o sistema reprodutor de fêmeas adultas.

## **2. Objetivos**

---

## 2. OBJETIVOS

### Objetivo Geral

- Analisar o desenvolvimento intra-uterino das microfilárias de *Litomosoides chagasfilhoi* sp. nov. através da microscopia óptica e da microscopia eletrônica de transmissão.

### Objetivos Específicos

- Analisar o aparelho reprodutor feminino de *Litomosoides chagasfilhoi* sp. nov. através da microscopia óptica.
- Analisar ultraestruturalmente a da formação da bainha das microfilárias (ovo, microfilárias intra-uterina e microfilárias sangüíneas) de *Litomosoides chagasfilhoi* sp. nov. utilizando técnicas de processamento de amostras para Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).

### **3. Referência Bibliográfica**

---

### 3. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ANDERSON, R.C., BAIN, O. Keys to the genera of the order *Spirurida*. *Diplotriaeñoidea*, *Aproctoidea* and *Filarioidea*. In: ANDERSON, R.C., CHABAUD, A.C., WILLMOTT, S. (ed) **Keys to the nematode parasites of vertebrates**. London, Commonwealth Agricultural Bureau, Farnham Royal Bucks, 1976.

ANDERSON, R.C. Order spirurida-Suborder Spirurina. In: **Nematode parasites of vertebrates: their development and transmission** 2 ed. Oxon: CABI Publishing, 1992. Cap 7, p. 436-520.

ANDERSON, R.C. Order spirurida-Suborder Spirurina. In: **Nematode parasites of vertebrates: their development and transmission** 2.ed. Oxon: CABI Publishing, 2000. Cap.7, p. 436-520.

ARAÚJO, A.C.G., FIGUEREIDO-SILVA, J., SOUTO-PADRÓN, T. DREYER, G. NORÕES, J., DE SOUSA, W. Scanning electron microscopy of adult *Wuchereria bancrofti* (Nematoda: Filarioidea). **Journal of Parasitology**, v. 81, n.3, p. 468-474, 1995.

BAIN, O. La cellule R1 des microfilaires (Nematoda) initiale du mesenchyme. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**, v. 45, p. 227-235, 1970.

BAIN, O., DISSANAYAKE, A.S., CROSS, J.H., HARINASUTA, C. SUCHARIAT, S. Morphologie de *Wuchereria bancrofti* adulte et sub-adulte. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**, v. 60, p. 613-630, 1985.

BESTCHART, B. WYSS, R. Analysis of the cuticular collagens of *Ascaris suum*. **Acta Tropica**, v.47, p.297-305, 1990.

BIRD, A.F. The nematode cuticle and its surface. In: Zuckerman, B. M. (Ed.) *Nematodes as Biological Models*. New York: **Academic Press**, p.213-236. 1980.

BIRD A.F., BIRD J. The structure of nematodes. **Academic Press**, San Diego, p. 1-95, 1991.

BUCK, A.A. Filarial Infections. In: STRICKLAND, G.T. **Hunter's Tropical Medicine**. 7. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1991. p. 711-749.

COX, G.N., KUSCH, M., EDGAR, S.R. Cuticle of *Caenorhabdits elegans*: its isolation and partial characterization. **Journal Cell Biology**, v. 90, p. 7-17, 1981a.

COX, G.N., STAPRANS, S., EDGAR, S.R. The cuticle of *Caenorhabdits elegans*. II - Stage-specific changes in ultrastructure and protein composition during postembryonic development. **Developmental Biology**, v. 86, p. 456-470, 1981b.

COX, G. N., SHAMANSKY, L. M., BOISVENVE, R. *Haemonchus contortus*: evidence that the 3A3 collagen gene is a member of the evolutionary conserved family of nematode cuticle collagens. **Experimental Parasitology**, v. 70, p. 175-185, 1990.

COX, G.N. Molecular and biochemical aspects of nematode collagens. **Journal of Parasitology**, v. 78, p. 1-15, 1992.

DE SOUZA, W., SOUTO-PADRÓN, T., DREYER, G., DIAS DE ANDRADE, L. Fine structure and localization of anionic sites on the surface of microfilaria of *Wuchereria bancrofti*. **Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology**, Bologna, v.21, n.1, p.121-129, 1989a.

DEVANEY, E. Lecitin-binding characteristics of *Brugia pahangi* microfilariae. **Tropical Medicine and Parasitology**, Stuttgart, v.36, p.25-28, 1985.

DREYER, G., SANTOS, A., NORÕES, J., ROCHA, A., ADDISS, D. Amicrofilaraemic carriers of adult *Wuchereria bancrofti*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, p. 288-289, 1996.

FURMAN, A., ASH, L.R. Analysis of *Brugia pahangi* microfilariae surface carbohydrates: comparison of the binding of a panel of fluoresceinated lectins to mature in vivo-derived and immature in utero derived microfilariae. **Acta Tropica**, Basel, v.40, p.45-51, 1983a.

GALLIARD, H., CHABAUD, A. G. Sur la morphologie de *Wuchereria bancrofti* (Cobbold) provenant du Tonkin et de Tahiti. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**, v. 28, p. 237-238, 1953.

HOFFMEISTER, K., WENK, P. Experiments on the regulation of worm load in the rodent filariid *Litomosoides carinni* (Nematoda, Filarioidea) in *Sigmodon hispidus*. **Mitteilungen der Österreichischen Gesellschaft für Tropenmedizin und Parasitologie**, v. 13, p. 119-124, 1991.

KANAGASUNTHERAM, R., SINGH, M., HO, B.C. AND CHAN, H.L. Some ultrastructural observations on the microfilaria of *Breinlia sergenti* - the excretory complex, rectal cells and anal vesicle. **International Journal for Parasitology**, v. 4, p. 7-15, 1974a.

KANAGASUNTHERAM, R., SINGH, M., HO, B.C., YAP, E.H. AND CHAN, H.L. Some ultrastructural observations on the microfilaria of *Breinlia sergenti* - nervous system. **International Journal for Parasitology**, v. 4, p. 489-495, 1974b.

KAUSHAL, N.A., SIMPSON, A.J.G., HUSSAIN, R., OTTESEN, E.A. *Brugia malayi*: stage-specific expression of carbohydrates containing N-acetyl-D-glycosamine on the sheathed surfaces of microfilariae. **Experimental Parasitology**, New York, v. 58, p.182-187, 1984.

KOZEK, W.J. Ultrastructure of the microfilaria of *Dirofilaria immitis*. **Journal of Parasitology**, v. 54, p. 838-844, 1971.

MACIEL, A., ROCHA, A., MARZOCHI, K.B.F., MEDEIROS, Z., CARVALHO, A.B., REGIS, L. SOUZA, W., LAPA, T., ANDRÉ FURTADO. Epidemiological study of bancroftian filariasis in Recife, Northeastern Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 4, p. 449-455, 1996.

MARTINEZ A.M.B., DE SOUZA, W. A freeze-fracture and deep-etch study of the cuticle and hypodermis of infective larvae of *Strongyloides venezuelensis* (Nematoda). **International Journal of Parasitology**, v. 27, p. 289-297, 1997.

McLAREN, D. J. Ultrastructural studies on microfilariae (Nematoda: Filarioidea). **Parasitology**, London, v. 65, p. 317-332, 1972.

McLAREN, D. J. Oogenesis and fertilization in *Dipetalonema viteae* (Nematoda: Filarioidea). **Parasitology**, London, v. 66, p. 465-472, 1973.

MEDEIROS, Z., DREYER, G., ANDRADE, L. D., PIRES, M. L., MENDES, J., PIMENTEL, R. *Wuchereria bancrofti* microfilarial density of autochthonous cases and natural *Culex* infectivity rates in Northeast Brasil. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, p. 214-217, 1992.

MICHAEL, E., BUNDY, D.A.P., GRENFELL, B.T. Re-assessing the global prevalence and distribution of lymphatic filariasis. **Parasitology**, v. 112, p. 409-428, 1996.

MORAES-NETO, A.H.A., LANFREDI, R.M. *Litomosoides chagasfilhoi* sp. nov. (Nematoda: Filarioidea) parasitizing the abdominal cavity of *Akodon cursor* (Winge, 1887) (Rodentia: Muridae) from Brazil. **Parasitology Research**, Berlin, v. 83, p. 137-143, 1997a

MORAES-NETO, A.H.A., LANFREDI, R.M. Prevalence of two species of *Litomosoides* (Nematoda: Filarioidea) parasites of *Akodon cursor* (Rodentia: Muridae) from Southeastern Brazil. **Revista Brasileira de Biologia**, Brasil, v. 57, n. 4, p. 579-582, 1997b

MORAES-NETO, A.H.A., LANFREDI, R.M., DE SOUZA, W. Fine structure, freeze-fracture and deep-etch views of the sheath and cuticle of microfilariae of *Litomosoides chagasfilhoi* (Nematoda: Filarioidea). **Parasitology Research**, v. 87, p. 1035-1042, 2001.

MORAES-NETO, A.H.A., LANFREDI, R.M., DE SOUZA, W. Deep-etched view of the cuticle of adults of *Litomosoides chagasfilhoi* (Nematoda: Filarioidea). **Parasitology Research**, v. 88, p. 849-854, 2002.

MORGAN, T.M., SUTANTO, I., PURNOMO, SUKARTONO, PARTONO, F., MAIZELES, R.M. Antigenic characterization of adult *Wuchereria bancrofti* filariae nematodes. **Parasitology**. v. 93, p. 559-569, 1986.

Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Coordenação Regional de Pernambuco. **Filariose**. Recife, 1990. 10 p. (Relatório).

NICOLSON, G.L. The interactions of lectins with animal cell surfaces. **International Review of Cytology**, New York, v.39, p.89-190, 1974.

NORÕES, J., ADDISS, D., AMARAL, F., COUTINHO, A., MEDEIROS, Z., DREYER, G. Ultrasonographic evidence of abdominal lymphatic vessel in young man with *Wuchereria bancrofti* infectin in the scrotal area. **Journal of Urology**, v. 152, p. 409-412, 1996.

OTTESEN, E.A., DUKE, B.O.L., KAREN, M., BEHBEHANI, K. Strategies and tool for the control/elimination of lymphatic filariasis. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 75, n. 6, p. 491-503, 1997.

PEIXOTO, C.A. (1996). Estudo Ultraestrutural e citoquímico da cutícula do *Caenorhabditis elegans* (Nematoda: Rhabditida). Tese de Doutorado, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ.

PESSOA, S.B. Superfamília Filarioidea e família Filariidae In:\_\_\_\_\_ **Parasitologia Médica**. 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1967. Cap. 54-55, p. 641-664.

PETIT, G. Cellule R1 et musculature des filaires; analyse ultrastructurale (1). **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**, v. 56, p. 81-95, 1981.

PHILIPP, M., RUMJANECK, F.D. Antigenic and dynamic properties of helminth surface structure. **Molecular Biochemical Parasitology**, v. 55, p. 331-390, 1984.

POLITZ, S. M., PHILIPP, M. *Caenorhabditis elegans* as a model for parasitic nematodes: a focus on the on the cuticle. **Parasitology Today**, v. 8, p. 6-12, 1992.

PROUDFOOT, L., KUSEL, J.R., SMITH, H., HARNETT, W., WORMS, M.J., KENNEDY, M.W. The surface lipid of parasitic nematodes: organization and modifications during transition to the mammalian host environment. **Acta Tropica**, v.47, p.323-330, 1990.

PROUDFOOT, L., KUSEL, J.R., SMITH, H., KENNEDY, M.W. 1. Biophysical properties of the nematode surface. In: **Parasitic Nematodes – Antigens, Membranes and genes**. Kennedy, M.W. (Ed.). Taylor & Frances Ltd. London, New York, Philadelphia. 1991. 243p.

RAJAN, T.V., GUNDLAPALLI, A. V. Lymphatic filariasis. In: FEEDMAN, D.O. (ed) **Immunopathogenetic Aspects of Diseases Induced by Helminthic Parasites**. Basel: Karger, 1997. p. 125-158.

REY, L. *Wuchereria bancrofti* e a Filariase Linfática. In: \_\_\_\_\_ Parasitologia. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. Cap. 50, p. 542-564.

ROGERS, R., ELLIS, D.S, DENHAM, D.A. Studies with *Brugia pahangi*: 14. Intrauterine development of the microfilaria and a comparison with other filarial species. **Journal of Helminthology**, v. 40, p. 251-257, 1976.

SASA, M. **Humana filariasis** - a global survey of epidemiology and control. Tokio: University of Tokyo Press, 1976, 813p.

SEBASTINO, M., LASSANDRO, F., BAZZICALUPO, P. *Cut-1* a *Caenorhabditis elegans* gene coding for a Dauer-specific noncollagenous component of the cuticule. **Developmental Biology**, v. 146, p. 519-530, 1991.

SELKIRK, M.E. 2. Structure and biosynthesis of cuticular proteins of lymphatic filarial parasites. In: **Parasitic Nematodes – Antigens, Membranes and Genes**. Kennedy, M.W. (Ed.) Taylor & Francis Ltd. London, New York, Philadelphia. 1991. 243p.

SCHRAERMAYER, U., PETERS, W., ZAHNER, H. Formation by the uterus of a peripheral layer of the sheath in microfilariae of *Litomosoides carinii* and *Brugia malayi*. **Parasitology Research**, Berlin, v. 73, p. 557-564, 1987.

SCOTT, J.A, MACDONALD, E.M., TERMAN, B. A description of the stages in the life cycle of the filarial worm *Litomosoides carinii*. **The Journal of Parasitology**, v. 37, n. 5, p. 425-432, 1951.

SCOTT, A. L. Lymphatic-dwelling filariae. In: NUTTMAN, T. B. (ed.). **Lymphatic filariasis**. Bethesda: Imperid College Press, 2000. Cap. 2, p. 5-39.

TAYLOR, A. E. R. The Spermatogenesis and Embryology of *Litomosoides carinii* and *dirofilaria immitis*. **Journal of Helminthology**, London, v.34, p.3-12, 1960

TONGU, Y. Ultrastructural studies on the microfilaria. **Acta Medica Okayama**, Okayama, v. 28, p. 219-242, 1974

WENK, P. Der invasionweg der <sup>24</sup> zyklichen larven von *Litomosoides* Chandler, 1931 (Filariidae). **Zeitschrift für Pararitenkunde**, v. 28, p. 240-263, 1967.

WILLIAMS, R. W., BROWN, H.W. The development of *Litomosoides carinii* filariid parasite of the cotton rat in the tropical and mite. **Science**, v. 102, p. 482-483, 1945.

WILLIAMS, R. W., BROWN, H.W. The transmission of *Litomosoides carinii* filariid parasite of the cotton rat by the tropical and mite *Liponyssus bacoti*. **Science**, v. 103, p. 224, 1946.

WRIGHT, K.A. The nematode's cuticle – its surface and epidermis: function, homology, analogy – a current consensus. **Journal of Parasitology**, v. 73, p. 1077-1083, 1987.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Lymphatic Filariasis: the disease and its control**. Fifth report of the WHO Expert Committee on Filariasis. Geneva: WHO, 1992. 75p. (Technical Report Series, 821).

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Lymphatic Filariasis Infection & Disease: control strategies**. Malaysia: WHO/TDR – Division of Control of Tropical Diseases. Report of a consultative meeting held at the University Sains Malaysia Penang, Malaysia, 1994. 30p. (TDR/CTD/PENANG/94.1).

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Annual report on Lymphatic Filariasis: global programme to eliminate lymphatic filariasis (GPELF)**. Geneva: WHO, 2002. <http://www.filariasis.org>. (WHO/CDS/CPE/CEE/2002.28).

ZAMAN, V. Ultrastructure of *Brugia malayi* egg shell and its comparison with microfilarial sheath. **Parasitology Research**, v. 73, p. 281-283, 1987.

ZI-DA, C. Two additional morphological characteristics for differentiating adult *Wuchereria bancrofti* and *Brugia malayi*. **Chinese Medical Journal**, V.99, p.845-846,1986.

## **4. Artigo Científico**

---

## **Desenvolvimento Intra-uterino da Microfilária de *Litomosoides chagasfilhoi* sp. nov. (Nematoda: Filarioidea)**

Souza, R.M.C.<sup>1,2</sup>; Florêncio, M.S.<sup>1</sup>; Pimentel, R.N.<sup>1</sup> & Peixoto, C.A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Departamento de Patologia e Biologia Celular, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – FIOCRUZ, Recife* e <sup>2</sup>*Departamento de Biofísica e Radiologia, Universidade Federal de Pernambuco.*

### **RESUMO**

Recentemente foi descrita uma nova espécie de nematóide, a qual foi chamada de *Litomosoides chagasfilhoi*. O conhecimento dessa espécie é limitado e, portanto existe a necessidade de estudos para que se possa utilizá-la como modelo experimental em analogia às espécies parasitas do homem. Diante disso, o desenvolvimento intra-uterino dos embriões foi estudado desde a fertilização até o nascimento, usando microscopia eletrônica de transmissão e óptica. Apesar de ser uma espécie que parasita a cavidade torácica e abdominal de roedores encontramos, através da microscopia óptica, vermes adultos e microfilárias em órgãos de seus hospedeiros definitivos, os roedores. Vermes adultos com embrião em diferentes estágios do desenvolvimento foram observados na camada mais externa do coração, o pericárdio. Nas fêmeas o sistema reprodutivo é duplo apresentando forma de Y e inicia-se com os ovários na região posterior final. Estes apresentaram duas regiões – uma germinal, onde encontramos células germinativas e uma de crescimento, na qual foi observado oócitos primários. Cada ovário termina anteriormente em um curto e estreito oviduto (não observado) que conduz a um receptáculo seminal e aos tubos uterinos. Os úteros apresentam uma parede espessa constituída por uma lâmina basal e 2 tipos celulares e são divididos em três regiões: uma região proximal onde encontramos estágios iniciais da formação do zigoto como também a formação da mórula. Uma região média onde os embriões apresentam-se todos enrolados possuindo forma de ferradura “Pretzel”, e uma região distal com vários compartimentos preenchidos com microfilárias maduras revestida por uma bainha. No interior do útero, encontramos uma

eletrodensos que se distribuí em torno dos embriões intra-uterinos, como também, entre o embrião e a casca ovular. Os úteros se unem à vagina na extremidade final da parte anterior. A presença de embriões mortos foi observada tanto na parte central do útero como próximos à parede uterina. As bainhas, de ovos extraídos por dissecação, de fêmeas fertilizadas, apresentaram projeções eletrodensas de diferentes tamanhos sobre a superfície externa. Em microfilárias intra-uterina, a bainha, apresentou uma espessa e amorfa camada externa, semelhante a encontrada em microfilárias sanguíneas.

**Palavras Chaves:** Microfilárias; *Litomosoides chagasfilhoi*; Microscopia Eletrônica

### **ABSTRAT**

Recently a new species of nematode was described, which was called *Litomosoides chagasfilhoi*. The knowledge of this species is limited and several studies are necessary do that can use it as experimental model in analogy to the man's species parasites. Therefore, the intra-uterine development of the embryos was studied from the fertilization to birth, using transmission electron microscopy and optical. In spite of being a species that dwells the thoracic and abdominal cavity of rodents we found, through the optical microscopy, adult worms and microfilárias in side organs of the rodents. Adult worms with embryo in different stages of development were observed in the most external layer of the heart. The reproductive system of the females is double presenting Y-shape begins with the ovaries in the final posterior region. These presented two areas - a germinal one, where we found germinal cells and one of growth, in which primary oocytes was observed. Each ovary finishes previously in a short and narrow oviduct (not observed) that drives to a seminal receiver and the uterine tubes. The uteri present a thick wall constituted by a basal sheet and 2 cellular types and they are divided in three areas: an area proximal where we found initial formation of the zygote as well as the morula development. A medium area where the embryos presents horseshoe form (Pretzel), and an distal area

with several compartments filled with mature microfilariae covered by a sheat. Inside the uterus, we found an amorphous substance whit electron-dense aspect that it is distributed around the intra-uterine embryos, as well as, between the embryo and the sheat ovular. The uteri join to the vagina in the final extremity of the previous part. The presence of dead embryos was observed so much in the central part of the uterus as well close to the uterine wall. Sheats from eggs obtained by dissection, of fertilized females, presented electron-denses projections of different sizes on the external surface. In intra-uterine microfilariae, the sheat showed thick and amorphous external layer similar to that observed in blood microfilariae.

**Key Words:** Microfilariae; *Litomosoides chagasfilhoi*; . Electron Microscopia

## INTRODUÇÃO

A filariose é uma infecção causada por parasitas nematóides pertencentes à superfamília Filarioidea, que são encontrados parasitando homens e animais.

Recentemente foi descrita uma nova espécie, a qual foi chamada de *Litomosoides chagasfilhoi* sp. nov. em homenagem ao Prof. Carlos Chagas Filho. Essa espécie ocorre na cavidade torácica e abdominal de roedores *Akodon cursor* (Winge, 1887). O *L. sigmodontis* Chandler, 1931, *L. galizai* e *L. silvai* apresentam parentesco próximo a esta nova espécie, diferindo apenas em certos aspectos morfológicos (Moraes Neto, 1997a, 1997b).

Parasitas de animais que apresentam analogias quanto à estrutura e a biologia das espécies hospedeiras do homem, podem ser utilizadas para um melhor conhecimento das endemias causada pelas espécies que acometem o ser humano. Algumas espécies da família Onchocercidae foram descritas parasitando naturalmente roedores e são utilizadas como modelos experimentais, como a *Litomosoides sigmodontis* Chandler, 1931 que tem sido usada extensivamente em estudos anti-helmínticos, na imunologia e na bioquímica desde a descoberta dos detalhes de sua transmissão e desenvolvimento (Anderson, 2000).

Ambos os sexos de *L. chagasfilhoi*, apresentam corpo branco, longo, delgado e cilíndrico, ligeiramente afilado nas extremidades. O macho mede aproximadamente 2,19 a 3,0 cm de comprimento e 142 a 155,8 µm de diâmetro, a fêmea mede entre 8,7 a 9,50 cm de comprimento por 304 a 345 µm de diâmetro, e o embrião (microfilária) mede em torno de 100 µm de comprimento por 5,0 µm de diâmetro (Moraes Neto, 1997a).

Segundo Scott (2000), os filarídeos machos apresentam apenas um testículo que se origina perto da junção esôfago-intestino e se estende ao longo de todo o verme. O aparelho reprodutor das fêmeas apresenta duas ramificações idênticas, enroladas dentro da cavidade do corpo para acomodar seu comprimento que é aproximadamente 1,5 vezes maior que o próprio corpo. Os dois ramos do sistema reprodutivo formam um ducto comum

próximo à vulva, que por sua vez, está localizada na superfície ventral da região anterior. Cada ramificação do gonoducto apresenta uma zona proximal, semelhante a um ovário, onde ocorrem a formação das células germinativas e a maturação dos ovos, e uma zona semelhante a um útero onde o embrião se desenvolve. No ponto onde as duas zonas se unem, o epitélio modifica-se para estocar espermatozoides após a cópula, sendo esta estrutura denominada espermateca.

A embriogenese ocorre completamente no útero da fêmea. Um oócito fertilizado (zigoto) divide-se para dar forma a um embrião multicelular (mórula). Depois de vários ciclos da divisão celular, o embrião, dentro da casca do ovo, curva-se possuindo forma de ferradura, esta fase é chamada de Pretzel. Durante o desenvolvimento ele torna-se reto para formar a microfilária (Dafa'alla, et al., 2000).

As microfilárias apresentam uma bainha frouxa que circunda todo seu corpo e são conhecidas como "microfilárias embainhadas", para distinguir de outras microfilárias em que a membrana ovular é perdida antes do embrião ser liberado no hospedeiro definitivo. Estas últimas são conhecidas como "microfilárias desembainhadas". No caso das microfilárias embainhadas a bainha representa a maior área de interação entre o parasita e o hospedeiro.

O presente estudo teve como objetivo a caracterização do aparelho reprodutor feminino de *Litomosoides chagasfilhoi*, bem como o desenvolvimento intra-uterino e a formação das bainhas das microfilárias através da microscopia eletrônica de transmissão e da microscopia óptica.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

**Animais** - Roedores da espécie *Akodon cursor* (Winge, 1887), infectados experimentalmente pela equipe da Dra. Reinalda Lanfredi do Laboratório de Helminologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, foram enviados para o laboratório de Patologia e Biologia Celular do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM-FIOCRUZ) e mantidos adequadamente em biotério apropriado até o sacrifício.

**Obtenção dos Parasitas e Microfilárias** - Após sacrifício dos roedores, o sangue foi coletado para obtenção das microfilárias sanguíneas, em seguida, filarídeos adultos foram retirados da cavidade torácica e abdominal. Estes foram sexados e foram separados. A partir da dissecação das fêmeas fertilizadas foram obtidos os embriões em diferentes fases de desenvolvimento. Alguns órgãos como coração, pulmão, rim, fígado e baço foram retirados dos roedores para estudo histológico.

### **Microscopia Óptica**

**A) Estudo Morfológico dos órgãos de roedores *Akodon cursor*** - Os órgãos dos roedores foram fixados em Bouin (Lillie & Fullmer, 1976) durante 24 horas, desidratados em série crescente de etanol (70% a 100%), clarificados em xilol e incluído em parafina. Cortes longitudinais e transversais de 5 µm de espessura foram obtidos por microtomia (micrótomo Spencer AO) e corados pelo método da Hematoxilina-Eosina (H&E) (Lillie & Fullmer, 1976).

**B) Estudo Morfológico do aparelho reprodutor feminino** - Fêmeas fertilizadas foram observadas através de cortes histológicos nas regiões anterior, média e posterior. Este material foi fixado com glutaraldeído 3.0% em tampão cacodilato de sódio a 0.1M pH 7.4 overnight a 4°C. A desidratação, clarificação e inclusão foram a mesma utilizada para o estudo morfológico dos órgãos dos roedores. Cortes longitudinais e transversais de 4µm de espessura (micrótomo Spencer AO) foram corados pelos métodos da Hematoxilina-Eosina (H&E) (Lillie & Fullmer, 1976) e Tricrômio de Mallory (Mallory, 1938).

### **Microscopia Eletrônica de Transmissão (ROTINA)** (De Souza et al., 1989b)

Fêmeas adultas fertilizadas, microfilárias sanguíneas e liberadas do útero foram:

- Fixadas em glutaraldeído a 3.0% em tampão cacodilato de sódio a 0.1M pH 7.4, *overnight* a 4°C;
- Lavadas três vezes no mesmo tampão por 10 minutos cada;
- Pós-fixadas em Tetróxido de Ósmio a 1%, Ferricianeto de potássio a 0,8% cloreto de cálcio a 5 mM, em tampão cacodilato de sódio 0.1 M, pH 7.4 por 1 hora (Forbes et al., 1987);
- Lavadas 2 vezes por 10 min no mesmo tampão;
- Contrastadas “en bloco” com acetato de uranila a 5% em água destilada por 2 h em ambiente escuro;
- Submetidas a 3 lavagens de 10 min em água destilada;
- Desidratadas em série crescente de acetona: (30%, 50%, 70%, 90% e 3 vezes em 100%) por 20 minutos cada;
- As amostras foram infiltradas em Epon e acetona (1/2, 1/1, 2/1 e Epon puro por 24 h).
- Após a polimerização em estufa a 70°C por 48h, as amostras foram colocadas no dessecador por 24h.

Os cortes ultrafinos (60 a 70 nm) foram obtidos em ultramicrótomo Reichert Ultracut. Estes foram coletados em grades de cobre ou níquel (300 mesh), e contrastados em acetato de uranila por 20 minutos em ambiente escuro, e em citrato de chumbo por 5 minutos. As amostras foram analisadas em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 109.

## **RESULTADOS**

### **Análise Morfológica de órgãos do *Akodon cursor* infectado por *L. chagasfilhoi*.**

Vermes adultos foram observados na camada mais externa do coração, o pericárdio, do roedor. Observamos também no interior dos vermes adultos, microfilárias em diferentes estágios de desenvolvimento embrionário (Fig. 4.1). No interior de alguns vasos cardíacos, evidenciamos, microfilárias sangüíneas embainhadas (Fig. 4.2).

No rim, observamos na camada cortical, microfilárias no interior dos glomérulos de Malpighi (Fig. 5.1) e em vasos hipertrofiados (Fig. 5.2).

No fígado encontramos microfilárias no interior dos sinusóides hepáticos (Fig. 06) e no baço observamos microfilárias livres sem ocasionar alterações patológicas do mesmo (Fig. 07). Uma grande quantidade de microfilárias foi observada nos vasos pulmonares e no parênquima (Figs. 8.1, 8.2).

### **Análise Morfológica do Aparelho Reprodutor Feminino**

O sistema reprodutivo das fêmeas de *L. chagasfilhoi* é duplo e apresenta forma de Y. A abertura externa (vulva) está localizada na porção ventral da região anterior por trás da junção esôfago-intestino. A vulva se segue pela vagina e dois úteros, terminados pelos ovidutos e ovários.

Seguindo da porção posterior (cauda) para a porção anterior (vulva) do verme, o sistema reprodutivo inicia-se com os ovários na região posterior final do verme. Cada ovário apresentou duas regiões (Fig. 9.1) – uma região germinal e uma região de crescimento. Na região germinal do ovário observamos células germinativas e a divisão da oogônia. As oogônias apresentam um distinto núcleo com proeminente nucléolo e estão presas a um protoplasma central, o raque (Fig. 9.2). Na região de crescimento foram observados oócitos primários que aumentam de tamanho na região central do

ovário (Fig. 9.3), apresentam cromatina delicada e 1 único nucléolo. Cada ovário termina anteriormente em um curto, estreito oviduto (não foi observado) que conduz a um receptáculo seminal e a um duplo tubo uterino. Este foi observado (Fig. 10.1), com septos incompletos (Fig. 10.2), cujas paredes são espessas e apresentam numerosas células de citoplasma claro e vesiculado, com núcleo de cromatina delicada e, 1 a 3 nucléolos evidentes (Fig. 10.3).

Com base na maturação dos embriões, cada útero é dividido em três regiões funcionais: uma região proximal pequena, uma zona média extremamente longa e uma pequena região anterior.

A região proximal do útero é pequena e foram observados oócitos em diversas fases do desenvolvimento meiótico (Fig. 11.1), em estádios iniciais da formação do zigoto, e também a formação da mórula (Fig. 11.2). A região média ocupa quase todo comprimento do verme. Os embriões desta porção, depois de vários ciclos da divisão celular, apresentaram-se, de enrolados possuindo forma de ferradura (Pretzel), sendo todos envolvidos por uma fina bainha. (Fig. 12). Na região anterior do útero, foi relevada a presença de vários compartimentos uterinos preenchidos completamente com microfilárias maduras revestidas por uma fina bainha. Nesta etapa do desenvolvimento as microfilárias apresentam núcleos somáticos evidentes (Fig. 13.1).

Os úteros se unem à vagina na extremidade final da parte anterior. Foi observado que o epitélio da vagina consiste de grandes células sendo revestido pela cutícula. A vagina termina na vulva que está localizada no terço anterior do corpo do nematóide (Fig. 13.2).

### **Análise Ultraestrutural**

O útero das fêmeas de *L. chagasfilhoi* maduras apresentou uma parede com 13 mm de espessura, sendo composta por uma lâmina basal e 2 tipos celulares: um anel muscular circular cujas células encontram-se embebidas na lâmina basal, e um epitélio cubóide simples que reveste a porção interna da mesma (Fig. 14.1). A célula epitelial apresenta 3 sub-divisões: **a)** uma região de labirintos, cuja aparência se deve a inúmeras invaginações da membrana apical; **b)** uma região média contendo organelas tais como: inclusões lipídicas,

numerosos vacúolos eletroluscentes de diferentes tamanhos, grânulos altamente eletrodensos, núcleo de cromatina delicada evidenciando apenas um nucléolo (Fig. 14.2); e **c**) uma região esponjosa apresentando formações digitiformes voltadas para o lúmen e em contato íntimo com as microfilárias (Fig. 14.3).

Diversos estágios de desenvolvimento das microfilárias intra-uterinas foram observados. Entre eles destacaram-se a presença de mórulas constituídas por células cubóides com núcleos esféricos basais de cromatina clara, com nucléolo evidente. Numerosas mitocôndrias foram observadas na região supranuclear. Na região entre a mórula e a casca ovular não se observou qualquer substância amorfa eletrodensa (Fig. 15.1, 15.2).

Embriões, em estádios mais avançados do desenvolvimento, entram em contato com a casca do ovo do embrião adjacente (Fig. 15.3) ou com a parede uterina, formando “canais estreitos” com material eletrodenso.

Foi observado, no interior do útero, uma substância amorfa de aspecto delicado e eletrodenso, que se distribui em torno dos embriões intra-uterinos. Uma substância de aparência similar também foi observada entre o embrião e a casca ovular, muitas vezes tais substâncias encontravam-se aderidas uniformemente à cutícula (Fig. 15.4).

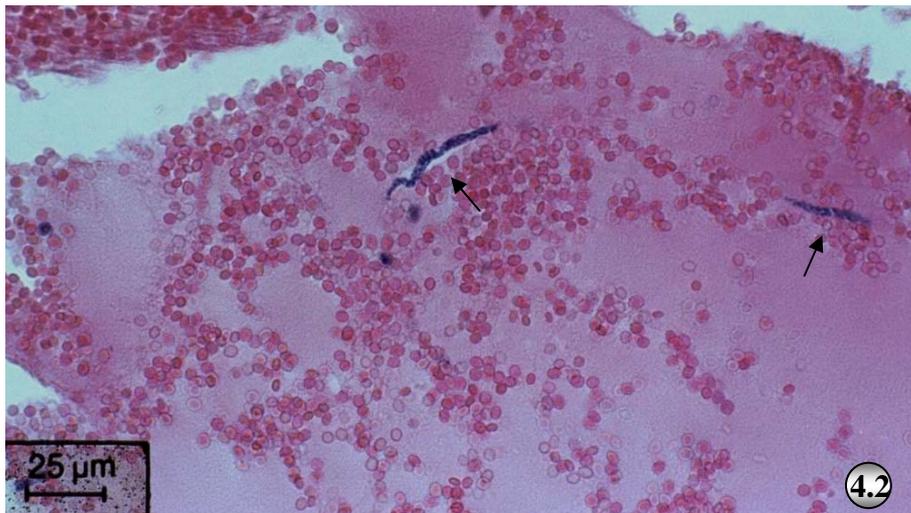
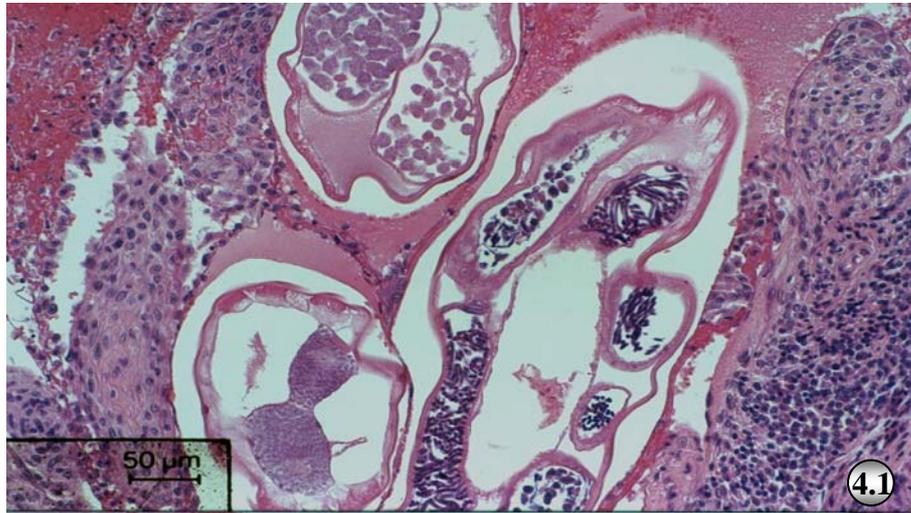
Os embriões continuam crescendo e se diferenciando até que a cutícula seja completamente formada (Fig. 16). Neste momento, os embriões se tornam enrolados possuindo forma de ferradura - fase de “Pretzel” (Figs. 17, 17.1). Nesta fase a parede uterina é espessa e os embriões envolvidos por uma casca ovular são vistos enterrados na mesma.

A presença de embriões mortos, totalmente desorganizados com áreas de necrose, sendo envolvidos por uma casca ovular (Fig. 18.1), foram observados na parte central do útero como também próximos à parede uterina. (Figs. 18.2, 18.3). As cascas ovulares sempre são maiores que os embriões e freqüentemente possuem invaginações profundamente dobradas entre outros embriões (Fig. 19). Quando os embriões estão completamente maduros a casca ovular se estende livremente em torno deles e é denominada de “bainha da microfilária”.

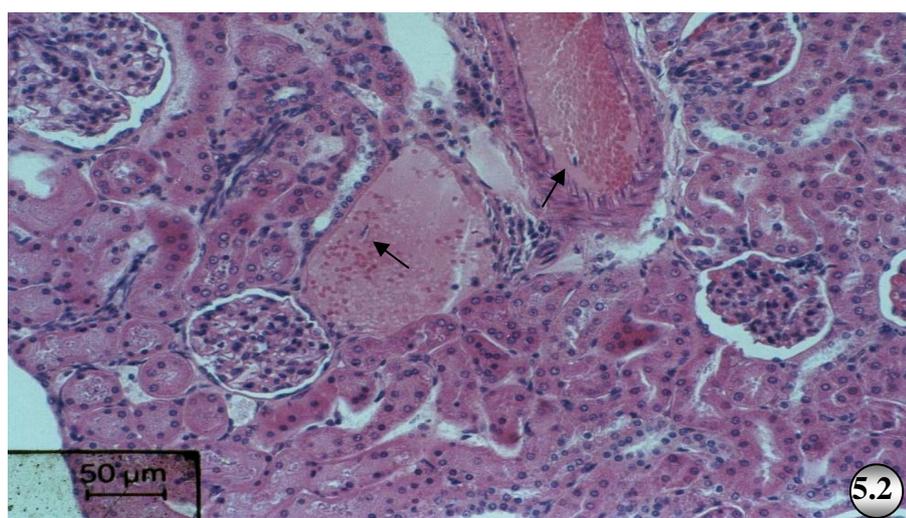
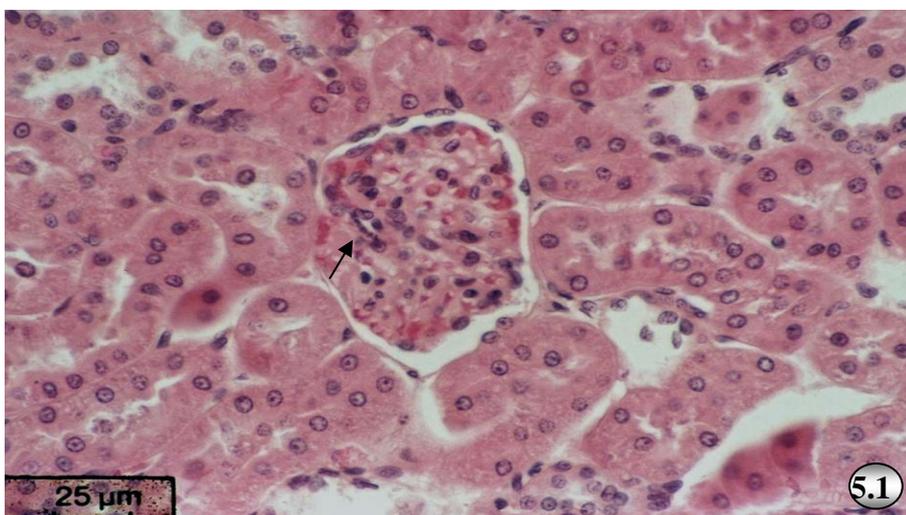
As bainhas de ovos extraídos por dissecação, de fêmeas fertilizadas, apresentaram projeções eletrodensas de diferentes tamanhos sobre a

superfície externa (Fig. 20.1). Em microfilárias intra-uterina, extraídas por dissecação, a bainha apresentou uma espessa e amorfa camada externa. (Fig. 20.2).

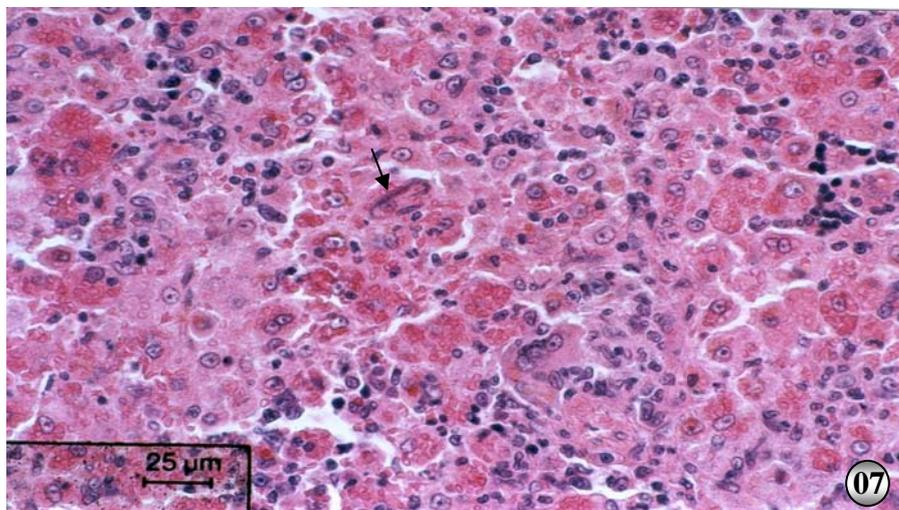
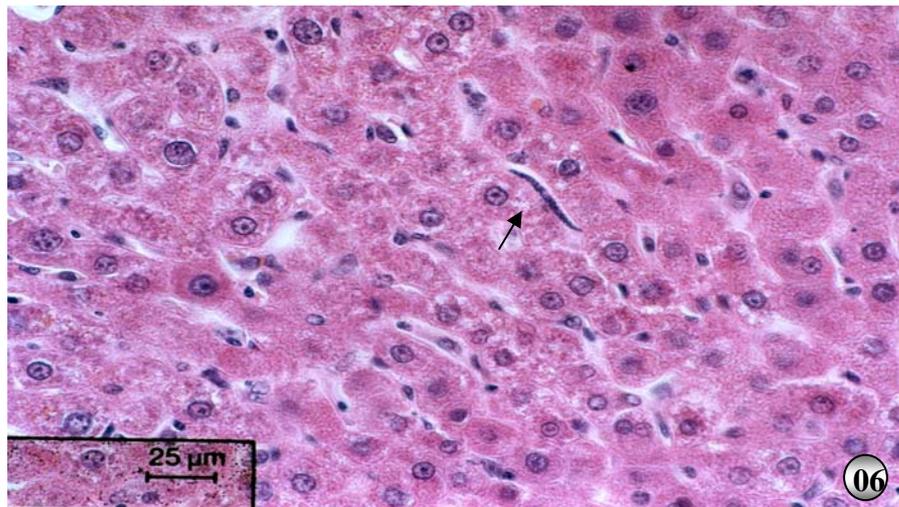
Cortes ultrafinos de microfilárias sangüíneas revelaram a presença de uma camada externa espessa constituída por um material eletrodenso, semelhante ao encontrado na bainha da microfilária intra-uterina (Figs. 20.3, 20.4).



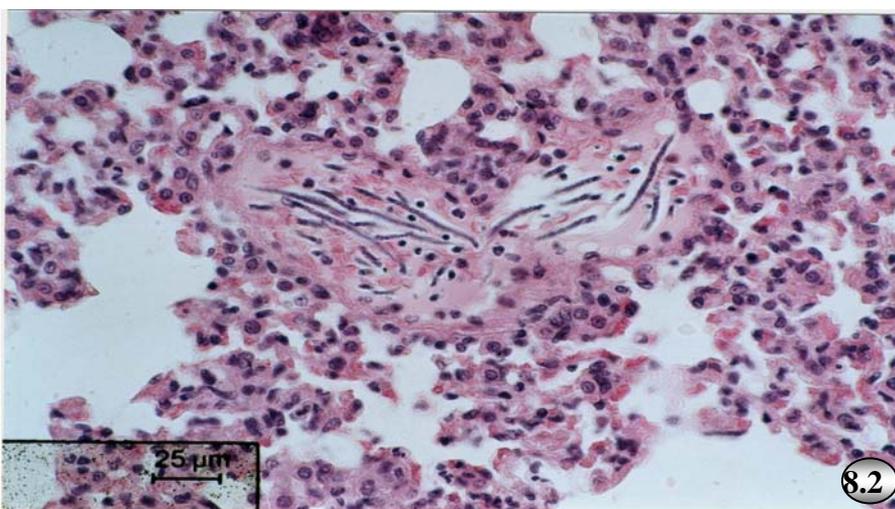
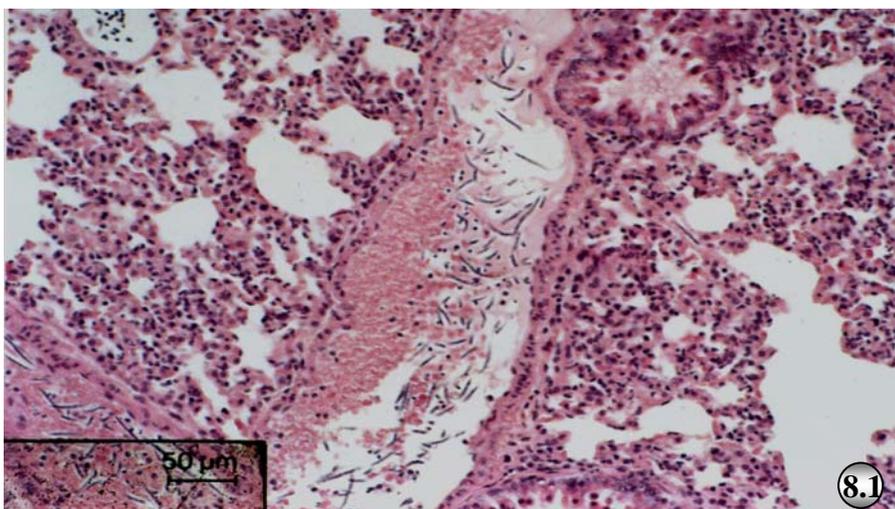
**Fig. 04.** Cortes do coração do roedor corados com H&E. **Fig. 4.1** O Pericárdio com vermes adultos de *Litomosoides chagasfilhoi* contendo no seu interior microfílarias em diferentes fases do desenvolvimento embrionário. **Fig. 4.2** Vaso cardíaco com microfílarias sangüíneas (setas).



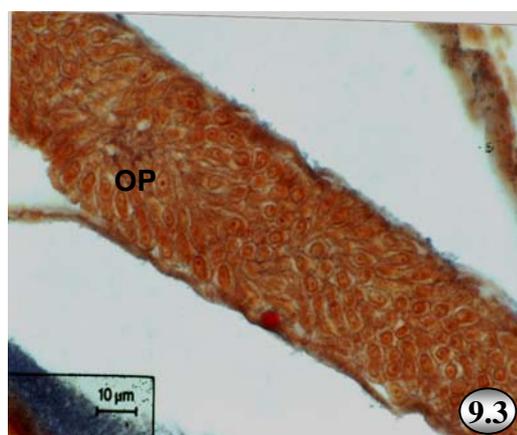
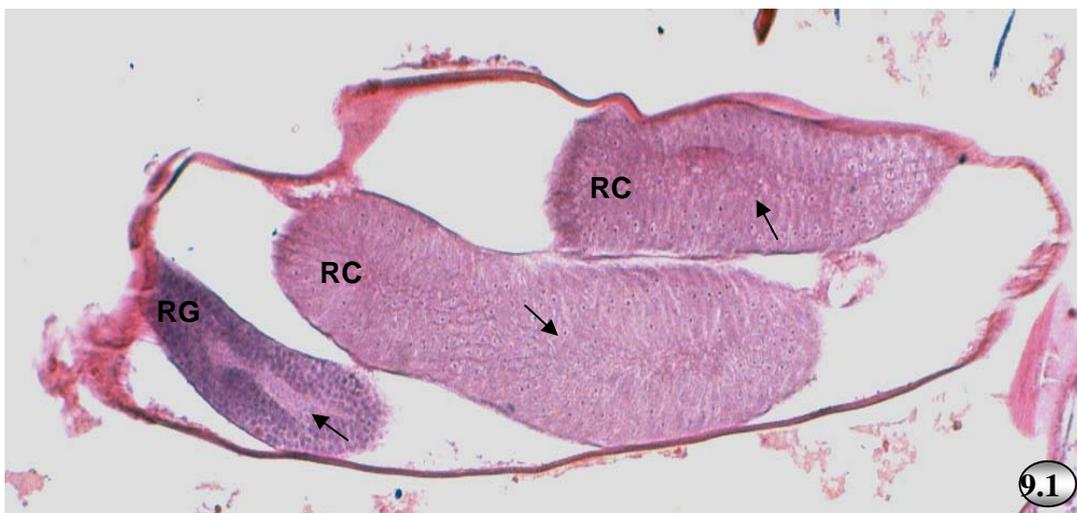
**Fig. 05.** Cortes dos Rins do roedor corados com H&E. **Fig. 5.1** Microfilárias no interior dos Glomérulos de Malpighi. **Fig. 5.2** Vasos hipertrofiados com Microfilárias (*setas*).



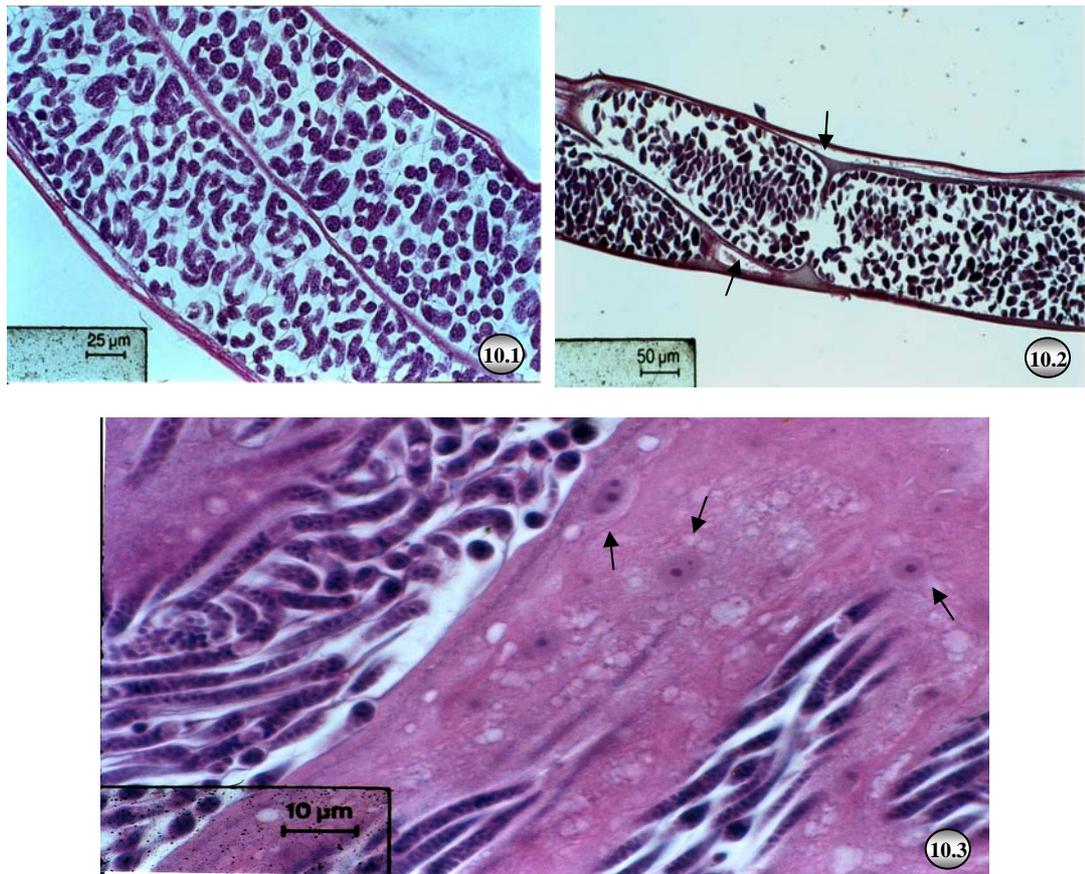
Cortes do Fígado e do Baço corados com H&E. **Fig. 06.** Microfilárias nos sinusóides hepáticos. **Fig. 07.** Microfilária no parênquima do baço (seta).



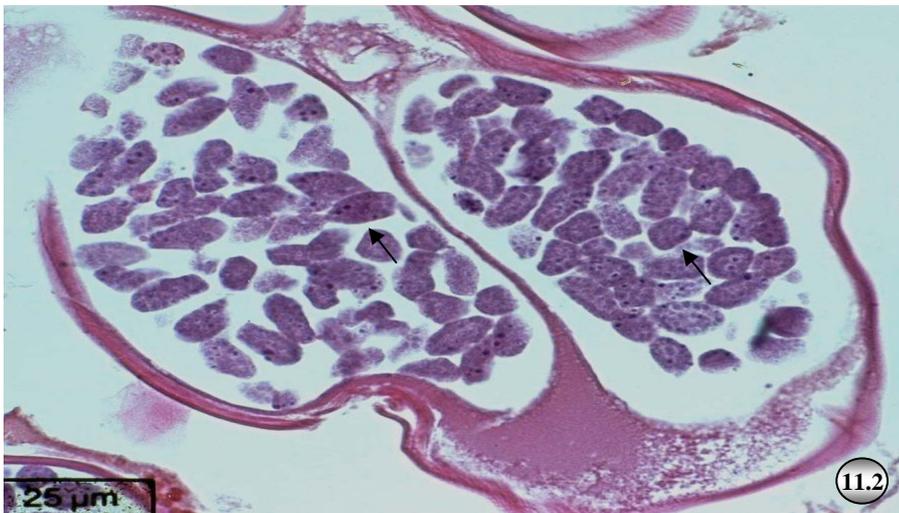
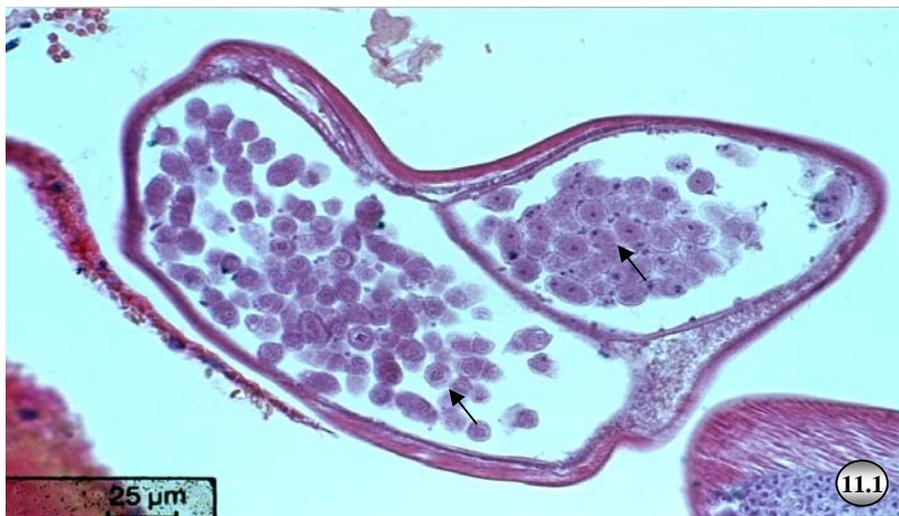
**Fig. 08.** Cortes do Pulmão corados com H&E. **Fig. 8.1- 8.2** Grande quantidade de microfíliarias nos vasos pulmonares.



**Fig. 09.** Cortes do ovário da fêmea de *Litomosoides chagasfilhoi*, corados com H&E e TM. **Fig. 9.1** Corte longitudinal do ovário da fêmea de *Litomosoides chagasfilhoi*, corado com Hematoxilina-Eosina. Região germinal do ovário (RG) com a zona de raque e região de crescimento (RC) onde os oócitos se organizam em torno do raque (*setas*). **Fig. 9.2** Corte longitudinal da região germinal do ovário, corado com Tricrômio de Mallory, apresentando oögonias (O). **Fig. 9.3** Corte longitudinal, da região de crescimento do ovário corado com Tricrômio de Mallory. Observamos oócitos primários voltados para a região central do ovário (OP).



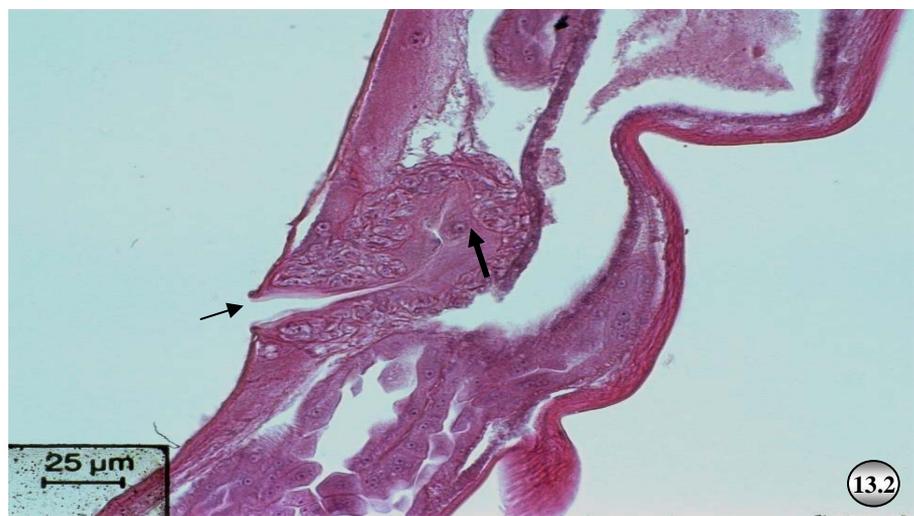
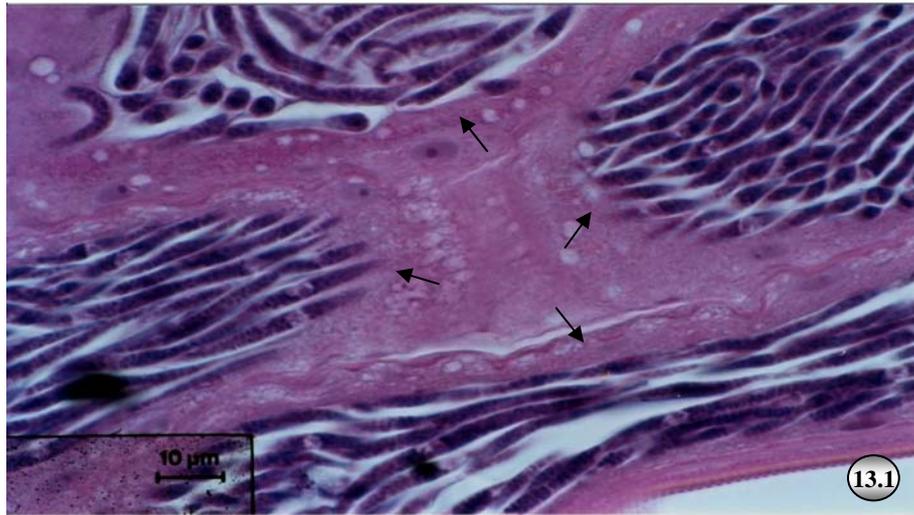
**Fig. 10** Útero da fêmea de *Litomosoides chagasfilhoi*, corte longitudinal, corados com HE. **Fig. 10.1** Duplo tubo uterino. **Fig. 10.2** Com septos incompletos (*setas*). **Fig. 10.3** Parede espessa do útero com células de citoplasma claro, possuindo 1 a 3 nucléolos (*setas*).



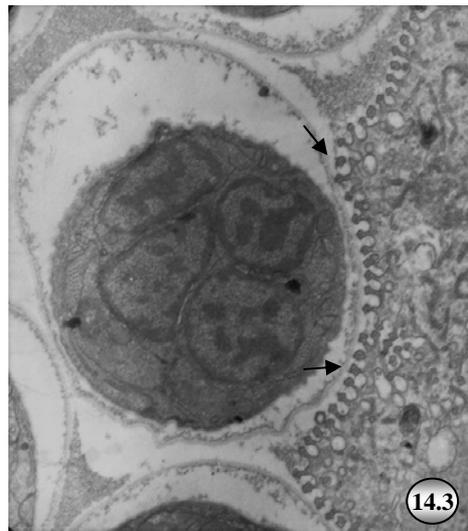
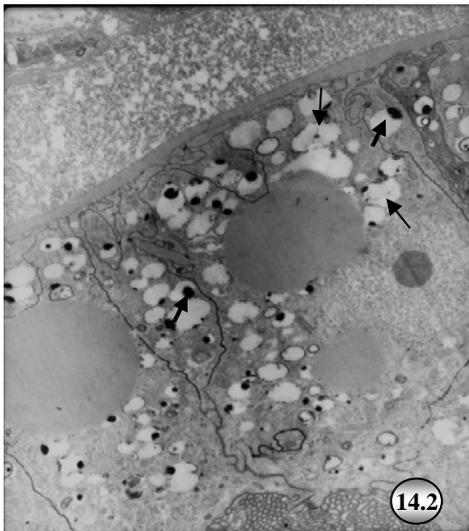
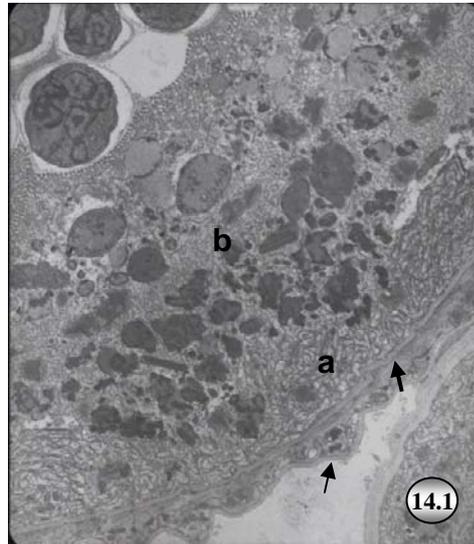
**Fig. 11.** Cortes da região proximal do útero, corados com H&E. **Fig. 11.1** Estágios iniciais do desenvolvimento do zigoto. Oócitos primários em divisão meiótica (setas) **Fig. 11.2** Formação da mórula (setas).



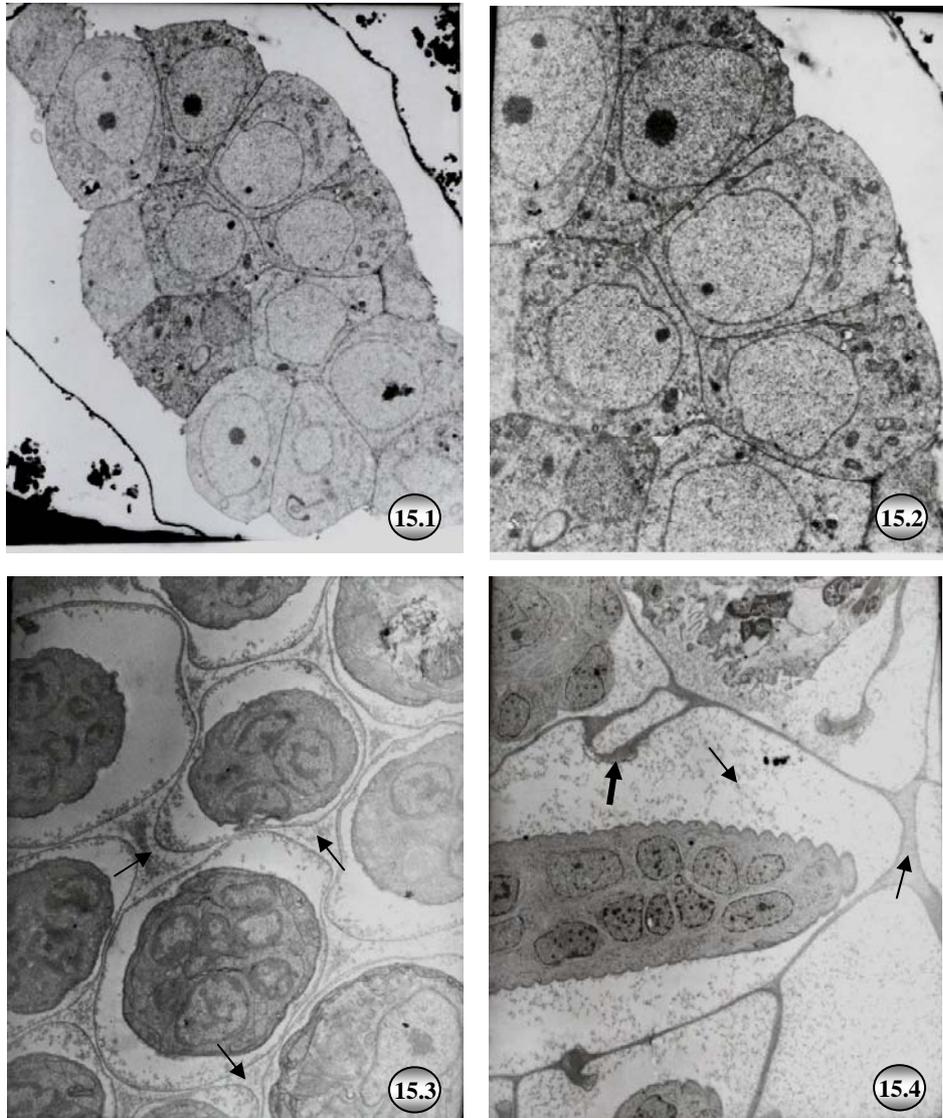
**Fig. 12.** Região média do útero, corado com H&E. Embriões apresentando forma de ferradura (“Pretzel”).



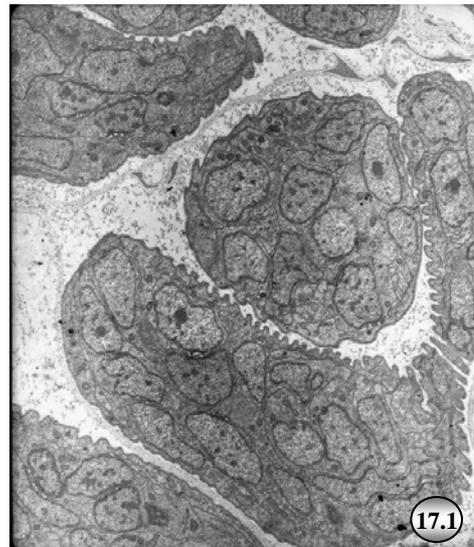
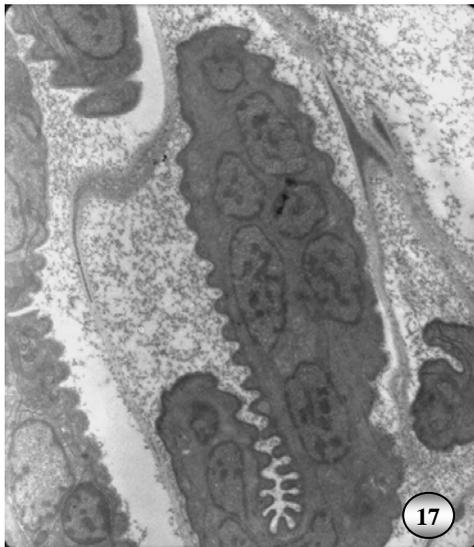
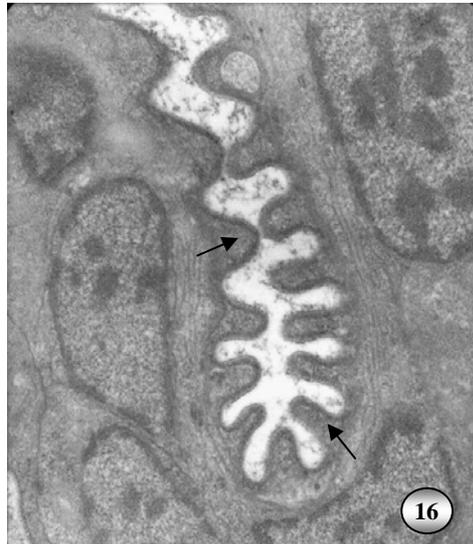
**Fig. 13.** Região anterior do útero, vagina e vulva, corados com H&E. **Fig. 13.1.** Vários compartimentos com embriões mais finos, delgados tornando-se retos para formar a microfíliarias maduras. **Fig. 13.2.** Vagina (seta larga) com vulva (seta fina) revestidas pela cutícula, e observamos grandes células em forma de rosetas .



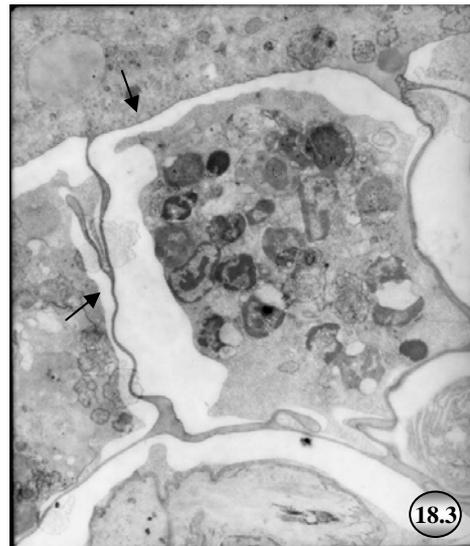
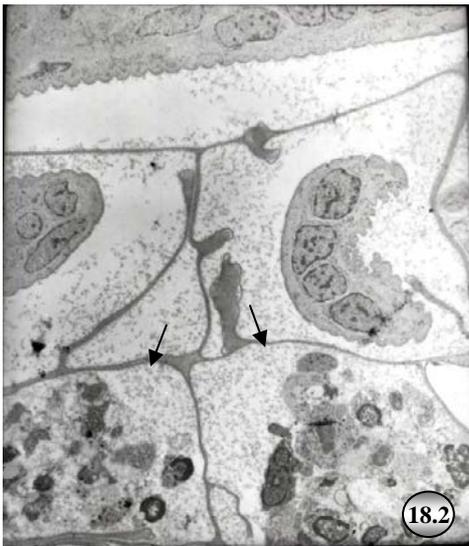
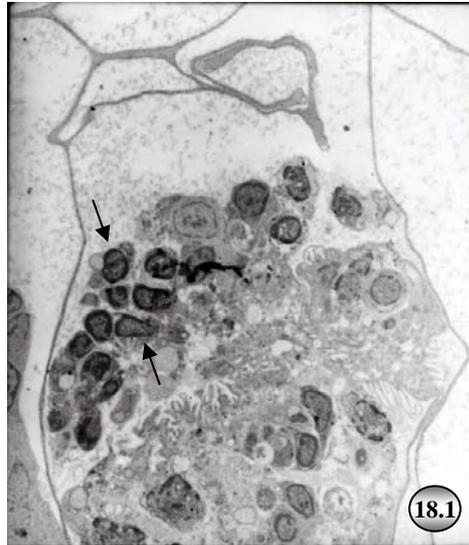
**Fig. 14.** Cortes longitudinais ultrafinos da parede do útero das fêmeas de *Litomosoides chagasfilhoi*. **Fig. 14.1** Lâmina basal (seta), anel muscular (seta grossa) e epitélio cubóide simples onde se observam a região de labirintos (a), e a região média com inúmeras inclusões lipídicas (b) 4500X. **Fig. 14.2** Região média da célula epitelial. Observamos numerosos vacúolos eletróluscentes (seta menor), grânulos densos (seta maior) e núcleo de cromatina clara e contendo apenas um nucléolo 6600X. **Fig. 14.3** Região esponjosa da célula epitelial apresentando formações digitiformes em contato com as microfíliárias (setas) 18000X.



**Fig. 15.** Cortes longitudinais ultrafinos de microfíliaras intra-uterinas em diferentes estágios do desenvolvimento embrionário. **Fig. 15.1-15.2** Mórula constituídas por células cubóides com núcleo esférico de cromatina clara, nucléolo evidente e numerosas mitocôndrias. Não foi observado substância amorfa entre a casca ovular e a mórula 6160X. **Fig. 15.3** Contato com a casca do ovo do embrião adjacente, formando canais (*setas*) 10500X. **Fig. 15.4** Substância amorfa, no interior do útero e entre a casca ovular e o embrião (*setas*). Também observamos canais (*seta grossa*) 4500X.



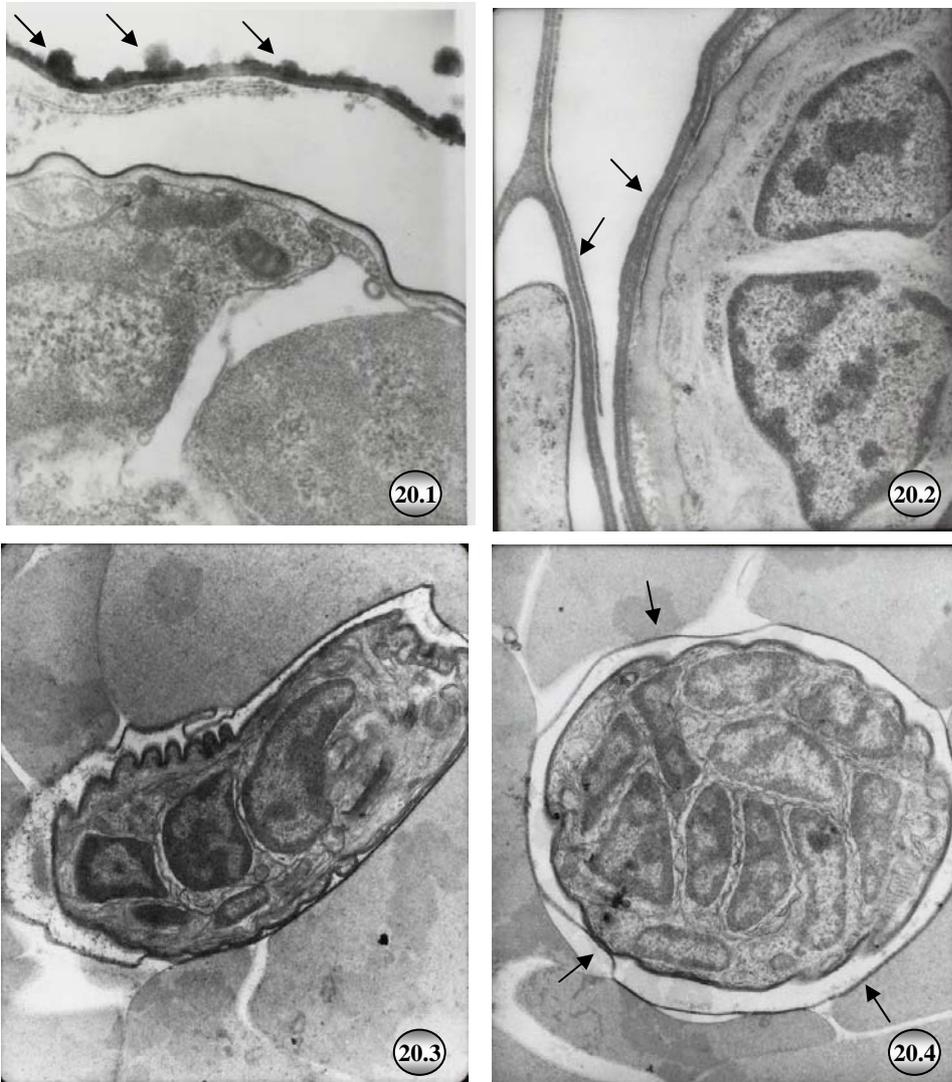
**Fig. 16.** Cutícula da microfilaria (*setas*) 30000X. **Fig. 17-17.1** Embriões enrolados em forma de ferradura – Fase de Pretzel 10500X, 6600X.



**Fig. 18.** Cortes longitudinais ultrafinos de microfíliaras intra-uterinas mortas. **Fig. 18.1** Total desorganização e áreas de necrose são observadas dentro de uma casca ovular (*setas*) 4500X. **Fig. 18.2-18.3** Microfíliaras mortas na parte central do útero e enterradas na parede uterina (*setas*) 4500X, 45000X.



**Fig. 19.** Microfilárias com cascas ovulares maiores que elas, invaginações dobradas entre os embriões (seta) 10500X.



**Fig. 20.** Cortes longitudinais ultrafinos de ovos, microfíliarias intra-uterinas e microfíliarias sangüíneas. **Fig. 20.1** Ovos apresentando em sua casca ovular projeções eletrodensas de diferentes tamanhos (*setas*) 42000X. **Fig. 20.2** Microfíliarias intra-uterinas com uma espessa e amorfa camada externa (*setas*) 30000X. **Fig. 20.3-20.4** Microfíliarias sangüíneas com uma camada externa espessa de material eletrodenso (*setas*) 18000X.

## DISCUSSÃO

A parede do útero da fêmea de *L. chagasfilhoi* mostrou-se similar à descrita por Franz (1988), em *Onchocerca volvulus*, apresentando uma lâmina basal, células musculares que estão embebidas na lâmina basal e células epiteliais que cobrem o lado interno da lâmina.

O *L. chagasfilhoi* é um nematóide que parasita a cavidade torácica e abdominal de roedores. Observamos neste estudo, através da microscopia óptica, a presença de vermes adultos e microfírias em alguns órgãos dos roedores. Vermes adultos com embriões em diferentes estágios de desenvolvimento foram observados na camada mais externa do coração, o pericárdio. Este achado é de extrema importância, pois não encontramos, na literatura, relatos sobre este assunto. Em *Dirofilaria immitis* os parasitas adultos residem preferencialmente no ventrículo direito e artérias pulmonares (Knight, 1987), porém outros órgãos podem ser afetados como, por exemplo, os rins (Rawlings, 1986). Observamos nos rins, a presença de microfírias no interior dos glomérulos de Malpighi, sem lesões glomerulares evidentes. Discordando dos resultados de Simpson *et al.* (1974) que encontraram alterações renais evidentes a nível intersticial e glomerular, quando estudava *D. immitis*. A presença de microfírias, também foi observado no fígado e baço, sem ocasionar alterações patológicas. No pulmão encontramos uma grande quantidade de microfírias dentro dos vasos pulmonares. Não foram encontrados na literatura dados comparativos entre o número de parasitas e a microfíremia (Abramowsky, *et al.*, 1981).

O aparelho reprodutivo da fêmea de *L. chagasfilhoi* sp. nov. é similar aos de outros membros da Superfamília Filarioidea, os quais têm sido descritos para *L. carinii* e *D. immitis* (Taylor, 1960), *D. immitis* (Lee, 1975), *Dipetalonema Witei* (Terry, 1961), *Dipetalonema viteae* (McLaren, 1973).

Observações ultraestruturais do ovário e do útero de *Dirofilaria immitis* revelaram algumas características, como: tamanho, estrutura e localização, da oogônia, oócitos e esperma uterino (Lee, 1975).

Segundo Neafie (1972) os ovários de *Onchocerca volvulus* ficam na porção posterior do verme. Cada ovário possui duas regiões: uma região proximal germinativa e uma região distal de crescimento. A produção de células germinativas e a divisão da oogônia acontecem no ovário germinal. Na região de crescimento, ocorrem a maturação dos oócitos primários. Lee (1975) estudando a ultraestrutura de *D. immitis* divide o ovário em três regiões: uma região distal (germinativa), uma região média (crescimento) e uma região proximal (maturação).

Prestage (1960) observou que na região germinal do ovário de *Ascaris lumbricoides* as células germinativas apresentam reservas de lipídeos. A presença dessas reservas indicaria que as células já não estavam se dividindo, iniciando o processo de armazenamento de nutrientes. Chitwood and Chitwood (1940) relataram que as células germinativas na fêmea de *Ascaris* não estão livres no oviduto, mas se agrupam ao redor de um eixo central, o raque. Este fenômeno também foi observado em alguns oxiurídeos, estrangilídeos e espirurídeos, mas, como apontou Prestage (1960), o raque não é uma característica constante dos nematóides.

Duke (1990), estudando a atividade reprodutiva da fêmea de *Onchocerca volvulus* mostrou que oogônias se dividem por mitose para dar origem aos oócitos primários. Essa divisão mitótica é observada raramente, sendo os oócitos primários resultantes, muito numerosos e ocupam completamente o lúmen do ovário (McLaren, 1973). A transformação das oogônias em oócitos primários envolve mudanças no tipo e no número de organelas (Lee, 1975). Segundo Prestage (1960) os oócitos primários não foram mostrados em continuidade com o raque, mas orientados em direção a ele.

Lee (1975) estudando o desenvolvimento de oócitos de *D. immitis* descreveu inúmeros raques no centro do ovário deste filarídeo que serviam como centro de ligação dos oócitos, formando rosetas em torno de cada raque. Esta estrutura de acordo com Prestage (1960), teria função nutritiva para os oócitos. Duke *et al.* (1990), mostrou que os oócitos estão presos a um raque até alcançarem a maturidade, depois movem-se pela porção de crescimento do ovário, em direção ao oviduto e ao receptáculo seminal. No receptáculo

seminal os oócitos entrariam em contato com os espermatozóides. Segundo Lee (1975), oócitos maduros, antes da fertilização, são morfologicamente distintos dos oócitos primários da região de crescimento do ovário. É evidente que o oócitos maduros próximos ao oviduto, já sofreram a primeira divisão de maturação, sendo, portanto oócitos secundários. Os oócitos que se encontram perto do oviduto, são grandes, redondos e estão livres no lúmen do ovário (Lee, 1975).

Nossas observações em *L. chagasfilhoi*, demonstraram que as oogônias e os oócitos primários estavam ligados através de processos semelhantes a regiões residuais centrais denominadas de raque. As oogônias possuíam forma regular, mesmo quando se aproximavam da zona de raque, discordando dos resultados de Hulinska and Shaikenov (1982), que demonstraram que as oogônias de *Trichinella spiralis* e *T. nativa* apresentavam forma regular na região apical do ovário e forma irregular quando se aproximavam do raque. Com relação aos oócitos primários, observamos que os oócitos aumentam em tamanho para a região central do ovário, confirmando as observações feitas por Hulinska and Shaikenov (1982).

Apesar de numerosos estudos realizados sobre fertilização e embriogênese de nematóides, o momento exato da penetração do espermatozóide no oócito provavelmente nunca foi observado em microscopia eletrônica. Acredita-se que os oócitos são fertilizados logo após entrarem no útero (Foor, 1968). Alguns autores como: Duke (1990) e Neafie (1972), *Onchocerca volvulus*; Sacchi *et al.* (2001) e Lee (1975), *Dirofilaria immitis*; Terry (1961) e McLaren (1973), *Dipetalonema viteae*; Lýsek and Ondrus (1992), *Ascaris lumbricoides*, Hulínská and Shaikenov (1982), *Trichinella spiralis* e *T. nativa*, afirmam que a fertilização ocorre no receptáculo seminal também conhecido como espermateca que está localizado na porção caudal do útero na sua junção o oviduto. Mas, Taylor (1960), estudando *Litomosoides carinni* e *Dirofilaria immitis* e Dafa'alla *et al.* (2000), estudando *Litomosoides sigmodontis*, afirmam que a fertilização dos oócitos ocorre na zona de raque do ovário.

De acordo com Foor (1968, 1970), os conteúdos do espermatozóide entram no oócito imediatamente após a fusão da membrana plasmática do

espermatozóide com a oolema. Em *D. immitis*, o mesmo autor observou uma membrana de espermatozóide solta dentro do oócito. Foor (1970) sugeriu que este englobamento do espermatozóide era o resultado de “algum mecanismo de fagocitose”. Mais tarde, Foor sugeriu que a fertilização em *D. immitis* acontece por endocitose o que foi confirmado pelos resultados de Sacchi *et al.* (2001) que documentou invaginações da oolema em volta do espermatozóide, além de ter mostrado que o espermatozóide dentro do ooplasma é coberto por uma membrana plasmática intacta e por uma membrana externa, que ele interpretou como sendo membrana de endocitose. Sacchi *et al.* (2001), não exclui a possibilidade que o espermatozóide pudesse entrar no oócito por outros mecanismos, como por exemplo, por “via clássica” de fusão da membrana, mas durante seus estudos, não foram observados outros mecanismos de penetração. Endocitoses já haviam sido descritas por McLaren (1973) em *Dipetalonema viteae*, mas este mecanismo foi interpretado como um mecanismo de destruição de espermatozóides. Segundo Sacchi *et al.* (2001), a interpretação mais simples e imparcial da informação disponível é que a fertilização em nematóides filariais, ou pelo menos em *D. immitis*, acontece por endocitose. Infelizmente, não foi possível, no nosso estudo, observar o momento da penetração do espermatozóide no oócito e nem onde essa fertilização ocorre.

Taylor (1960) descreve o zigoto resultante da fertilização, de *L. carinni* como sendo oval, com citoplasma granular, e apresentando um núcleo central com nucléolo. Em *L. chagasfilhoi* o zigoto apresentou-se similar ao descrito por Taylor (1960). Aspectos ultraestruturais da formação do zigoto em *D. immitis* (Lee, 1975) concordam com os descritos por Foor (1968) em *A. lumbricoides*.

Estudos morfológicos em *A. lumbricoides* demonstraram que a formação da casca do ovo é um resultado imediato da fertilização (Foor, 1967; Lee & Lestan, 1971). De acordo com Kagei (1960), depois da fertilização dos oócitos de *Setaria cervi*, desenvolve-se uma membrana que provavelmente é análoga à casca do ovo de *Brugia pahangi* estudada por Roger *et al.* (1976).

Estudando o desenvolvimento intra-uterino da microfilária de *L. chagasfilhoi*, observamos a presença de uma casca ovular bastante definida em ovos fertilizados. Nos primeiros estágios da divisão celular, essa casca se

separa da camada mais externa das células do embrião. Esses dados foram confirmados por Roger *et al.* (1976) quando estudavam o desenvolvimento intra-uterino de *B. pahangi*. Ainda, segundo esses autores, a casca do ovo se torna bastante enrolada no estágio em que o embrião apresenta 32 células e que secreções apócrinas uterinas que teriam por função alimentar os embriões passariam por canais formados pela proximidade das cascas de ovos adjacentes. Em nossa análise ultraestrutural da formação da microfilária no interior do útero, verificamos que essas estruturas não existem, sendo apenas um espaço entre os embriões próximos, preenchidos por uma secreção eletrodensa, que possivelmente teriam função nutritiva para os embriões. Também poderiam ter função lubrificatória, facilitando assim a passagem dos embriões pelo útero, como foi sugerido por Rogers *et al.* (1976). Schraermeyer *et al.* (1987), estudando o desenvolvimento do embrião de *B. malayi* e *L. carinni* sugeriram que tais secreções seriam oriundas do complexo de Golgi da célula uterina e que seriam liberados no lúmen do útero, posteriormente essas secreções seriam depositadas sobre as bainhas das microfilárias. A presença de secreções no lúmen do útero, como também entre o embrião e a casca ovular, foi observada no presente estudo.

A morte de embriões em desenvolvimento de *L. chagasfilhoi* foi provavelmente ocasionada por aglomeração e por um rápido aumento de tamanho, concordando com os resultados de Roger *et al.* (1976). Todos os embriões encontrados mortos estavam envolvidos por uma casca ovular, existindo assim, material nutritivo entre eles. Segundo Roger *et al.* (1976), o material nutritivo encontrado passando entre os embriões eram levados pelos embriões adjacentes. Nós discordamos deste resultado, pois se não houvesse material nutritivo suficiente, os embriões não teriam aumentado tão rapidamente de tamanho. Roger *et al.*, (1976), ainda sugerem que as microfilárias se desenvolvem mais rapidamente quando existe um contato direto com a parede uterina. Esse mecanismo asseguraria um aumento no abastecimento de nutrientes. Nós encontramos microfilárias mortas em contato direto com a parede uterina, confirmando mais uma vez, que o fracasso dos embriões não é por falta de nutrientes. Outros trabalhos observaram morte embrionária. Embriões se degenerando foram vistos por Terry *et al.* (1961) em

*D. viteae*. Vicente *et al.* (1975), estudando a ultraestrutura de *B. malayi* observaram óvulos se degenerando em fêmeas inférteis.

Na análise morfológica do aparelho reprodutor da fêmea de *L. chagasfilhoi* constatamos a presença de subcompartimentos intra-uterinos que provavelmente estão relacionados à diferenciação embrionária.

Estudos anteriores, utilizando a microscopia eletrônica descreveram a organização geral da superfície da microfilária em algumas espécies como *L. carinii* (Schardein *et al.* 1968; McLaren 1972; Schraermeyer *et al.* 1987), *L. loa* (McLaren 1972), *B. pahangi* (Hammerberger *et al.* 1984; Sayers *et al.* 1984) e *W. bancrofti* (De Souza *et al.* 1989). Os resultados obtidos mostram que a bainha não é uma estrutura homogênea e que sua morfologia varia de acordo com a espécie e o estágio de desenvolvimento microfilarial (Schraermeyer *et al.* 1987).

McLaren (1972) observou que a bainha de microfilárias sanguíneas de *L. loa* e *L. carinii* era composta por uma camada uniforme de material eletrodense, não limitada por membranas. De acordo com a autora esse material seria derivado de componentes do sangue do hospedeiro que se depositavam sobre a bainha. No espaço entre a bainha e a cutícula da microfilária encontra-se um material amorfo e de distribuição espessa.

Tongu (1974), estudando a ultraestrutura de microfilárias sanguíneas de *B. malayi*, descreve a bainha como sendo uma estrutura composta por uma delicada membrana e por um material granular denso. Este último apresenta uma espessura variada, assemelhando-se a pequenas projeções. O espaço entre a cutícula e a bainha estava preenchido por um material homogêneo e pouco denso. Foi observado semelhante material eletrodense sobre a bainha de *L. loa* por Kosek & Orhiel (1983). Zaman (1987) realizando análises comparativas referente a ultraestrutura da casca do ovo e da bainha de *B. malayi*, descreveu projeções eletrodensas tanto na superfície da casca ovular como sobre a bainha da microfilária sanguínea. Para este autor, a bainha da microfilária seria derivada da casca ovular. Porém para Schraermeyer *et al.* (1987), a bainha de microfilárias de *B. malayi* e *L. carinni* seria formada pela

casca ovular e por secreções uterinas que se depositariam sobre os embriões durante o seu desenvolvimento.

No presente estudo, evidenciamos bainhas de ovos fertilizados com pequenas projeções sobre sua superfície, como também bainhas de microfilárias sangüíneas com uma camada externa espessa constituída por um material eletrodenso. A presença destas pequenas projeções poderia ser explicada pela possível aderência de materiais durante o processamento das amostras para microscopia eletrônica. Enquanto que o material eletrodenso assemelha-se ao encontrado na bainha de microfilárias intra-uterinas, devendo ser, portanto, a morfologia mais real desta estrutura. No espaço entre a microfilária e a bainha foi encontrado material homogêneo e pouco denso, concordando com os resultados descritos por Tongu (1974).

## CONCLUSÕES

O *Litomosoides chagasfilhoi* pode parasitar cavidades torácicas, abdominais e regiões internas dos órgãos dos roedores.

O aparelho reprodutor da fêmea mostrou-se similar ao descrito para outros membros da Superfamília Filarioidea.

Oogônias e oócitos primários encontravam-se ligados a um raque. As oogônias apresentam forma regular, mesmo próximas ao raque e os oócitos primários mostram-se de tamanho na região central do ovário.

Em ovos fertilizados, foi observada a presença de uma casca ovular bastante definida, que nos primeiros estágios da divisão celular separa-se da camada mais externa das células do embrião.

Em análise ultraestrutural, vimos que a formação de canais repletos por secreções apócrinas uterinas, descrito por alguns autores, são de fato espaços entre os embriões próximos, preenchidos por secreção eletrodensa que teriam função nutritiva e lubrificatória. Essa secreção tanto foi observada no lúmen do útero como entre o embrião e a casca ovular.

A morte dos embriões teria sido ocasionada pelo aglomeramento e por um rápido aumento de tamanho do mesmo, não por falta de substâncias nutritivas, como descrito por alguns autores. Embriões mortos foram encontrados, tanto no lúmen do útero como próximos à parede uterina.

As bainhas de ovos fertilizados apresentam pequenas projeções sobre sua superfície, derivadas provavelmente do processamento das amostras para microscopia eletrônica. As microfilárias sangüíneas, por sua vez, mostraram uma camada espessa de material eletrondenso, semelhante ao encontrado nas bainhas das microfilárias intra-uterinas.

Através do presente trabalho e de estudos realizados anteriormente, podemos concluir que existem diferenças significativas no desenvolvimento intra-uterino das microfilárias de *Litomosoides chagasfilhoi*, sendo necessários estudos posteriores, para uma melhor compreensão desta espécie.

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABRAMOWSKY, C.R., POWERS, K.G., AIKAWA, M., *et al.*, *Dirofilaria immitis*. 5. Immunopathology of filarial Nephropathy in dogs. **The American Journal of Pathology**, v. 104, n. 1, p. 1-12, 1981.

ANDERSON, R.C. Order spirurida-Suborder Spirurina. In: **Nematode parasites of vertebrates: their development and transmission** 2.ed. Oxon: CABI Publishing, 2000. Cap.7, p. 436-520.

CHITWOOD, B. G., CHITWOOD, M. B. **An Introduction to Nematology**. Baltimore: Monumental Printing Co., 1950. 180p.

DAFA'ALLA, T.H., TAUBERT, A., HOBOM, G., BECK, E. ZAHNER, H. Molecular characterization of a *Litomosoides sigmodontis* protein involved in the development of the microfilarial sheath during embryogenesis. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 106, p. 37-50, 2000.

DE SOUZA, W., SOUTO-PADRÓN, T., DREYER, G., DIAS DE ANDRADE, L. Fine structure and localization of anionic sites on the surface of microfilaria of *Wuchereria bancrofti*. **Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology**, Bologna, v.21, n.1, p.121-129, 1989a.

DE SOUZA, W., SESSO, A., SOUTO-PADRÓN, T., MACHADO, R.D., HADDAD, A., SILVEIRA, M., BARTH, O.M. **Manual sobre técnicas básicas em microscopia eletrônica**. V.I - Técnicas básicas. Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica. 1989b. 105p.

DUKE, B.O.L., ZEA-FLORES, G., GANNON, R.T. On the reproductive activity of the female *Onchocerca volvulus*. **Tropical Medicine Parasitology**, v. 41, p. 387-402, 1990.

FOOR, W. E. Ultrastructural aspects of oocyte development and shell formation in *Ascaris lumbricoides*. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v.53, p.1245-61, 1967.

FOOR, W. E. Zygote formation in *Ascaris lumbricoides*. **Journal of Cell Biology**, New York, v.39, p. 119-34, 1968.

FOOR, W.E. Spermatozoon morphology and zygote formation in nematodes. **Biology of Reproduction**, suppl. 2, p. 177-202, 1970.

FORBES, M. S., PLANTHOLD, B. A., SPERELAKIS, N. Cytochemical staining procedures selective for sarcotubular systems of muscle: modification and applications. **Journal of Ultrastructural Research**, v. 60, p. 306-327, 1987.

FRANZ, M. The morphology of adult *Onchocerca volvulus* based on electron microscopy. **Tropical Medicine and Parasitology**, v.39, p. 359-366, 1988.

HAMMERBERGER, B., RIKIHISA, Y., KING, M.W. Immunoglobulin interactions with surfaces of sheathed and unsheathed microfilariae. **Parasite Immunology**, v. 6, p. 1443-1450, 1984.

HULÍNSKÁ, D. AND SHAIKENOV, B. The ultrastructure of the reproductive system, and the oogenesis of two day-old, fertilized females of *Trichinella spiralis* and *T. nativa*. **Folia parasitological (PRAHA)**, v. 9, p. 39-44, 1982.

KAGEI, N. Morphological studies on thread worm, *Filarioidea*. **Acta Medica University Kagoshima**, v. 2, p. 142-149, 1960.

KNIGHT, D.H., Heartworm infection. : [The Veterinary clinics of North America. Small animal practice](#), v. 17, p. 1463-1517, 1987.

KOZEK, W. J., ORIHEL, T. C. Ultrastructural of *Loa loa* microfilaria. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 13, n. 1, p. 19-43, 1983.

LEE, D. L., LESTAN, P. Oogeneses and egg shell formation in *Heterakis gallinarum* (Nematoda). **Journal of Zoology**, London, v.164, p.189-96, 1971.

LEE, CHIN-CHIN. *Dirofilaria immitis*: Ultrastructural Aspects of Oocyte Development and Zygote Formation. **Experimental Parasitology**, New York, v.37, p.449-468, 1975.

LILLIE, R.D. & FULLMER, H., 1976. Histopathologic technic and practical histochemistry. 4 ed. New York, McGraw – Hill, 942p

LÝSEK, H. AND ONDRUS, J. Morphology of the uterus of *Ascaris lumbricoides* in the region where fertilization and formation of egg-shell occur. **Folia Parasitológica (PRAHA)**, v. 39, p. 41-50, 1992.

McLAREN, D. J. Ultrastructural studies on microfilariae (Nematoda: Filarioidea). **Parasitology**, London, v. 65, p. 317-332, 1972.

McLAREN, D. J. Oogenesis and fertilization in *Dipetalonema viteae* (Nematoda: Filarioidea). **Parasitology**, London, v.66, p.465-472, 1973.

MORAES-NETO, A.H.A., LANFREDI, R.M. *Litomosoides chagasfilhoi* sp. nov. (Nematoda: Filarioidea) parasitizing the abdominal cavity of *Akodon cursor* (Winge, 1887) (Rodentia: Muridae) from Brazil. **Parasitology Research**, Berlin, v. 83, p. 137-143, 1997a

MORAES-NETO, A.H.A., LANFREDI, R.M. Prevalence of two species of *Litomosoides* (Nematoda: Filarioidea) parasites of *Akodon cursor* (Rodentia: Muridae) from Southeastern Brazil. **Revista Brasileira de Biologia**, Brasil, v. 57, n. 4, p. 579-582, 1997b

NEAFIE, R.C., M.S. Morphology of *Onchocerca volvulus*. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 57, n. 5, p. 574-586, 1972.

PRESTAGE, J. J. The fine structure of the growth region of ovary in *Ascaris lumbricoides* var. suum with special reference to the rachis. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v.46, p.69-78, 1960.

RAWLINGS, C.A. Other Heartworm Syndromes. *In: Heartworm Disease in Dogs and Cats*. Philadelphia: W.B. Saunders, 1986, cap. 7, p.175-207.

ROGERS, R., ELLIS, D.S, DENHAM, D.A. Studies with *Brugia pahangi*: 14. Intrauterine development of the microfilaria and a comparison with other filarial species. **Journal of Helminthology**, v. 40, p. 251-257, 1976.

SACCHI, L., CORONA, S., CASIRAGHI, M., BANDI, C. Does fertilization in the filarial nematode *Dirofilaria immitis* occur through endocytosis of spermatozoa? **Parasitology**, v. 124, p. 87-95, 2001

SAYERS, G., MACKENZIE, C.D., DENHAM, D.A. Biochemical surface components of *Brugia pahangi* microfilariae. **Parasitology**, v. 89, p. 425-434, 1984.

SCHARDEIN, J. L., LUCAS, J.A., DICKERSON, C.W. Ultrastructural changes in *Litomosoides carinii* microfilariae in gerbils treated with thiethylcarbamazine. **Journal of Parasitology**, v. 54, p. 351-358, 1968.

SCHRAERMEYER, U., PETERS, W., ZAHNER, H. Formation by the uterus of a peripheral layer of the sheath in microfilariae of *Litomosoides carinii* and *Brugia malayi*. **Parasitology Research**, Berlin, v. 73, p. 557-564, 1987.

SCOTT, A. L. Lymphatic-dwelling filariae. *In: NUTTMAN, T. B. (ed.). Lymphatic filariasis*. Bethesda: Imperid College Press, 2000. Cap. 2, p. 5-39.

SIMPSON, C. F., GEBHARDT, B.M., BRADLEY, R.E., *et al.* Glomerulosclerosis in canine heartworm infection. **Veterinary Pathology**, v. 11, p. 506-514, 1974.

TAYLOR, A. E. R. The Spermatogenesis and Embryology of *Litomosoide carinni* and *Dirofilaria immitis*. **Journal of Helminthology**, London, v.34, p.3-12, 1960.

TERRY, A. *Dipetalonema witei*, filarial parasite of the jird, *Meriones Libycus*. II. The reproductive system, gametogenesis and development of the microfilaria. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v.47, p.703-711, 1961.

TONGU, Y. Ultrastructural studies on the microfilaria. **Acta Medica Okayama**, Okayama, v. 28, p. 219-242, 1974.

VINCENT, A. L., PARTONO, J. K., ASH, L. R. A comparison of the body wall ultrastructure of *Brugia pahangi* with that of *Brugia malayi*. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v.63, p.567-570, 1975.

ZAMAN, V. ultrastructure of *Brugia malayi* egg shell and its comparison with microfilarial sheath. **Parasitology Research**, v. 73, p. 281-283, 1987.