



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES
Mestrado em Saúde Pública



Marília Gabriela dos Santos Cavalcanti

**CARACTERIZAÇÃO CITOQUÍMICA ULTRA-
ESTRUTURAL DA CERCÁRIA de *Schistosoma mansoni***

RECIFE
2008

MARÍLIA GABRIELA DOS SANTOS CAVALCANTI

**CARACTERIZAÇÃO CITOQUÍMICA ULTRA-ESTRUTURAL DA
CERCÁRIA DE *Schistosoma mansoni***

Dissertação apresentada ao Mestrado em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientadores: Dr. Luiz Carlos Alves e
Dr. Fábio André Brayner dos Santos

**Recife
2008**

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

- C376c Cavalcanti, Marília Gabriela dos Santos.
Caracterização citoquímica ultra-estrutural da cercaria de *Schistosoma mansoni* / Marília Gabriela dos Santos Cavalcanti. — Recife: M. G. dos S. Cavalcanti, 2008.
112 p. : il., tabs.
- Dissertação (mestrado em saúde pública) — Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2008.
Orientador: Luiz Carlos Alves.
Co-orientador: Fábio André Brayner dos Santos.
1. *Schistosoma mansoni* – ultraestrutura. 2. Histocitoquímica. I. Alves, Luiz Carlos. II. Santos, Fábio André Brayner dos.

CDU 616.995.122

MARÍLIA GABRIELA DOS SANTOS CAVALCANTI

**CARACTERIZAÇÃO CITOQUÍMICA ULTRA-ESTRUTURAL DA
CERCÁRIA DE *Schistosoma mansoni***

Dissertação apresentada ao Mestrado em
Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu
Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para
obtenção do grau de Mestre em Ciências.

APROVADO EM: 14/01/2008

BANCA EXAMINADORA

Profº. Dr. Luiz Carlos Alves
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM-FIOCRUZ)

Profª. Dra. Constança Clara Gayoso Simões Barbosa
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM-FIOCRUZ)

Profº. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira
Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)

Profº. Dr. Fábio Lopes de Melo
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM-FIOCRUZ)

Profª. Dra. Valéria Wanderley Teixeira
Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)

Dedico

Aos meus pais, Francisco e Valdemira, aos meus irmãos, Cláudia e Helder e ao meu noivo Felipe Santana por serem o meu apoio em todos os momentos.

Ofereço

Aos meus orientadores e amigos Luiz Carlos e Fábio Brayner pelos ensinamentos que levarei por toda a vida e a Helena Araújo pelo ombro amigo.

AGRADECIMENTOS

A Deus que me concedeu todas as condições para chegar até aqui, mostrando o melhor caminho, guiando-me na direção certa.

Aos meus pais, Francisco de Assis e Valdemira Cavalcanti, e meus irmãos Cláudia e Helder que sempre estiveram ao meu lado e se esforçaram para que eu pudesse continuar minha jornada.

Ao Felipe Santana pelos ensinamentos, amor, amizade, paciência, carinho, respeito e confiança que sempre tem depositado em mim.

A toda minha família e a de meu noivo pelos momentos felizes, apoio, companheirismo e cumplicidade.

Aos meus orientadores e grandes amigos Fábio Brayner e Luiz Carlos, pela orientação, confiança, ensinamentos, companheirismo, paciência, estímulo e por todo o aprendizado durante minha caminhada científica.

À Helena Rocha pelo companheirismo, amizade e presença constante em todos os momentos da minha vida profissional.

Aos alunos de iniciação científica Fabiana Lira, Gabriela Brito, Sílvia, Henrique, Eduardo, Fernando Caldeira, Juvenal Júnior e Adriana Burgo pela ajuda imprescindível na realização dos experimentos.

À Lânia Ferreira pela oportunidade de poder começar a iniciação científica no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães.

Aos técnicos Sérgio Santos, Raimundo Pimentel do Deptº. de Biologia Celular e Ultra-estrutura do CPqAM/ FIOCRUZ e Rafael Padilha do Laboratório de Microscopia Eletrônica do LIKA pela ajuda no processamento das amostras e obtenção das fotos em microscopia eletrônica.

Às técnicas do Departamento de Parasitologia do CPqAM/FIOCRUZ, Fábria e Diana (CPqAM/FIOCRUZ), pela amizade, compreensão, e ajuda em todos os trabalhos que realizei.

Aos amigos e amigas do extinto Departamento de Biologia Celular e Ultra-estrutura do CPqAM/FIOCRUZ.

Ao diretor do LIKA, Dr. José Luiz de Lima Filho pela infra-estrutura que possibilitou a realização desta pesquisa.

À Carmel, Guilherme, Mércia e Simone pela amizade, carinho e força nos momentos difíceis.

À Nalva Menezes, Joselice Pinto, Nilda Lima e Ana Paula da secretaria Acadêmica do NESCC/CPqAM, pelo suporte essencial para conclusão deste trabalho.

A Lula e Robson Nascimento pela amizade, paciência, competência e ensinamentos indispensáveis na execução deste trabalho.

A toda equipe do Laboratório de Esquistossomose, Departamento de Parasitologia pela obtenção das cercárias para realização dos experimentos.

À Dra. Constança Clara Gayoso Simões Barbosa pelas contribuições que permitiram o aperfeiçoamento deste trabalho.

À Dra. Valéria Teixeira e Dr. Álvaro Teixeira pelas considerações feitas na dissertação e por ter aceitado participar da banca.

Ao Dr. Fábio Melo pela válida contribuição prestada à dissertação.

Ao Marcelo Paiva pela ajuda no desenvolvimento do artigo científico e a Duschinka pela amizade e apoio.

Aos amigos da informática e do serviço de xerox do CPqAM/FIOCRUZ por sempre me socorrer nas horas mais importantes.

Aos amigos da biblioteca pela colaboração na obtenção das informações científicas.

À Viviane, Gircelly, Aline, Soraya, Juliana, Joseane e Cybelle que sempre me apoiaram nos momentos mais difíceis e por fazerem parte da minha família.

Aos amigos do CIC pelos maravilhosos e inesquecíveis momentos juntos.

As minhas avós, Celina e Joana pelo carinho.

Aos meus companheiros da turma de mestrado 2006-2008 pelo apoio, carinho e companheirismo.

Por fim a todos os doutores, técnicos, estagiários, colaboradores e amigos do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-CPqAM/FIOCRUZ e do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami/LIKA que de alguma forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

*"Há homens que lutam um dia e são bons.
Há outros que lutam um ano e são melhores.
Há os que lutam muitos anos e são muito bons.
Porém, há os que lutam toda a vida.
Esses são os imprescindíveis."*

Bertolt Brecht.

CAVALCANTI, Marília Gabriela dos Santos. **Caracterização citoquímica ultra-estrutural da cercária de *Schistosoma mansoni***. 2007. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2008.

RESUMO

Uma alternativa para identificar a base de processos críticos necessários ao estabelecimento do parasito no hospedeiro é focar o estágio responsável pela invasão primária, ou seja, a estrutura infectante. O principal objetivo do trabalho foi realizar uma caracterização ultra-estrutural da cercária de *Schistosoma mansoni*, através de técnicas citoquímicas. Para a identificação de lipídios saturados e insaturados foi utilizado, respectivamente, as técnicas de Filipina e do Tampão Imidazol, para localização de proteínas básicas foram empregadas as técnicas do Ácido Fosfotúngstico (PTA) e da Prata Amoniacal. Para localizar sítios de cálcio utilizamos a técnica descrita por Hepler (1980) e para evidenciar grupamentos aniônicos empregamos ferritina cationizada além do tratamento enzimático com tripsina, condroitinase e neuraminidase de *Vibrio cholerae*. Foi observada a presença de lipídios insaturados de formato globular em toda a região externa da larva infectante, tegumento, glândula da cabeça, glândula pré-acetabular e corpos de inclusão. Utilizando a técnica de filipina, identificamos a presença de colesterol delimitando vários compartimentos da larva e também no tegumento, músculo e membranas de células subtegumentares. Através da técnica de PTA foi identificada a presença de proteínas básicas no tegumento, núcleo e nucléolo de células subtegumentares, corpos de inclusão e glândulas pré-acetabulares. Já na prata amoniacal, identificamos forte marcação em toda larva infectante além de marcações no núcleo das células musculares, tecido muscular circular e glândulas pré-acetabulares. A localização de sítios de cálcio mostrou-se bastante uniforme, demarcando os espaços internos da larva, principalmente, o tecido muscular da larva. As amostras tratadas com ferritina cationizada apresentaram uma forte marcação em nível cuticular. O tratamento das amostras com a neuraminidase não alterou o padrão de marcação dessas partículas na superfície do trematóide. Porém, o tratamento com tripsina ou condroitinase resultou numa ausência de marcação na superfície da larva. O esclarecimento da composição bioquímica da larva infectante de *S. mansoni* fornece dados para um melhor entendimento a respeito da biologia do parasito bem como a intrigante relação parasito-hospedeiro, além de contribuir para um possível controle químico.

Palavras chaves: Citoquímica. Ultra-estrutura. Cercária. *Schistosoma mansoni*.

CAVALCANTI, Marília Gabriela dos Santos. **Cytochemical Ultrastructural Characterization of Cercaria of *Schistosoma mansoni***. 2007. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2008.

ABSTRACT

An alternative to identify the basis for critical processes necessary for the establishment of the parasite in the host focus is the primary stage for invasion, the infective stage. The main objective of this work was to realize a structural characterization of cercaria of *Schistosoma mansoni*, through cytochemical techniques. For the identification of saturated and unsaturated lipids was used, respectively, Filipin and the buffer Imidazol techniques for localization of proteins basic were employed Acid Fosfotúngstico (PTA) and the Silver Amoniacal techniques. To locate calcium sites was used the technique described by Hepler (1980) and to highlight anionic groups employ cationized ferritin than enzymatic treatment with trypsin, chondroitinase and neuraminidase of *Vibrio cholerae*. It was observed the presence of unsaturated lipids of globular form in the infective larvae, husk, head of the gland, preacetabular gland and inclusion bodies. Using the technique of Filipin, identified the presence of cholesterol demarcate various compartments of the larvae and also in the husk, and muscle membranes of cells subtegumentares. Through the technique of PTA has identified the presence of protein in the husk basic, core and nucleolus cell subtegumentares, bodies of inclusion and glands pre-acetabulares. In ammoniacal silver, identified strong marking throughout infective larvae addition to highlighting the nucleus of muscle cells, muscle tissue and glands circular pre-acetabulares. The location of calcium sites has been fairly uniform, highlight the internal spaces of the larvae, especially the muscle cells. The samples treated with cationized ferritin made a strong mark on cuticula level. Treatment with neuraminidase of the samples did not alter the pattern of marking such particles on the surface of the trematode. However, treatment with trypsin or chondroitinase resulted in a lack of markings on the surface of the larvae. The clarification of the biochemical composition of the infective larvae of *S. mansoni* provides data for a better understanding about the biology of the parasite and the parasite-host relationship intriguing, in addition to contributing to a possible chemical control.

Keywords: Cytochemical. Ultrastructure. Cercaria. *Schistosoma mansoni*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ciclo de vida de <i>Schistosoma spp</i>	19
Figura 2	<i>Biomphalaria glabrata</i>	20
Figura 3	Vermes adultos (Macho e Fêmea) de <i>S. mansoni</i>	22
Figura 4	Ovo de <i>S. mansoni</i>	23
Figura 5	Desenho esquemático da cercária de <i>S. mansoni</i>	26
Figure 6	Desenho esquemático do tegumento da cercária de <i>S. mansoni</i>	27
Figura 7	Desenho esquemático do sistema nervoso da cercária de <i>S. mansoni</i>	30
Figura 8	Desenho esquemático do sistema excretório da cercária de <i>S. mansoni</i>	33

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1 Esquistossomose	16
2.2 Ciclo	18
2.3 Vetor	19
2.4 Morfologia do <i>Schistosoma mansoni</i>	21
2.4.1 Esquistossômulo	21
2.4.2 Vermes Adultos	21
2.4.3 Ovo	23
2.4.4 Miracídio	23
2.4.5 Esporocisto	24
2.4.6 Cercária	25
2.4.6.1 <i>Tegumento</i>	26
2.4.6.2 <i>Musculatura</i>	29
2.4.6.3 <i>Sistema Nervoso</i>	30
2.4.6.4 <i>Sistema Digestivo</i>	31
2.4.6.5 <i>Órgãos Secretores</i>	32
2.4.6.6 <i>Sistema Excretório</i>	33
2.5 Citoquímica	34
2.5.1 Localização de Lipídios Saturados	34
2.5.2 Localização de Lipídios Insaturados	35
2.5.3 Localização de Partículas Carregadas Negativamente	35
2.5.4 Localização de Cálcio	36
2.5.5 Localização de Proteínas Básicas	36
3 JUSTIFICATIVA	38
4 PERGUNTA CONDUTORA	40

5 HIPÓTESE	42
6 OBJETIVOS	44
6.1 Geral	45
6.2 Específicos	45
7 MATERIAIS, MÉTODOS E RESULTADOS	46
Artigo 1: Cytochemical characterization of lipids in the cercaria of <i>Schistosoma mansoni</i> .	48
Artigo 2: Ultrastructural and Cytochemical Aspects of the cercaria of <i>Schistosoma mansoni</i> .	68
8 DISCUSSÃO	90
9 CONCLUSÕES	97
10 REFERÊNCIAS	99
ANEXOS	110
Anexo A: Parecer da Comissão de Ética do CPqAM/FIOCRUZ	111
Anexo B: Confirmação de Submissão do Artigo, Revista: Parasitology	112

1- INTRODUÇÃO

A esquistossomose é uma doença parasitária causada pelo helminto *Schistosoma mansoni*. Esta helmintíase é uma endemia mundial, atingindo 74 países e territórios, principalmente na América do Sul, África, Caribe e leste do Mediterrâneo. Em termos de extensão de área endêmica e quantidade de pessoas infectadas, esta doença continua a ocupar a segunda posição no mundo entre as parasitoses (LESCANO et al., 2004; KATZ; ALMEIDA, 2003).

O *S. mansoni* apresenta um ciclo de vida heteroxênico, no qual o parasita apresenta vários estágios evolutivos adaptados para cada situação que varia desde o caramujo até seu hospedeiro definitivo (SCHNEIDER; ZELCK, 2001).

O estágio responsável pela infecção no hospedeiro definitivo é a cercária de *S. mansoni*. Esta fase evolutiva é especializada em executar as funções de locomoção, encontro do hospedeiro, invasão do mesmo e de maturar-se em vermes sexualmente maduros (DORSEY et al., 2002).

A ultra-estrutura da larva infectante do *S. mansoni* tem sido examinada por muitos anos resultando no acúmulo de muitas informações, porém a maioria desses trabalhos está concentrada em órgãos e sistemas ou em áreas limitadas da larva tal como o tegumento (DORSEY et al., 2002).

Como as cercárias irão evoluir até os vermes adultos, o estudo da mesma pode ser entendido como uma investigação sobre o estágio adulto prematuro, pois células germinativas das cercárias irão dar origem a vários órgãos do verme adulto (DORSEY et al., 2002).

Uma alternativa para identificar a base de processos críticos necessários ao estabelecimento do parasita no hospedeiro é focar o estágio responsável pela invasão primária, ou seja, o estágio infectante. Para isso, faz-se necessária uma análise ultra-estrutural citoquímica para que se possa obter dados que certamente deverão ser utilizados para o melhor entendimento da biologia do parasito bem como esclarecer a intrigante relação parasito-hospedeiro.

2- REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Esquistossomose

A esquistossomose também conhecida, no Brasil, como "barriga d'água", "xistose" ou "mal-do-caramujo" é causada por vermes trematódeos do gênero *Schistosoma*. Várias espécies desse gênero apresentam importância epidemiológica como: *S. haematobium*, *S. japonicum*, *S. intercalatum* e *S. mekongi* (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1998).

As espécies do gênero *Schistosoma* que afetam o homem chegaram às Américas no século XVII através do tráfico de escravos e com imigrantes orientais e asiáticos (nos quais foram detectados numerosos indivíduos parasitados pelo *S. haematobium* e *S. japonicum*). Entretanto, apenas o *S. mansoni* aqui se fixou, pelo encontro de bons hospedeiros intermediários (*Biomphalaria*) e pelas condições ambientais semelhantes às da região de origem (NEVES et al., 2005).

A presença desta parasitose é um indicador de atraso sócio-econômico e representa um sério problema de saúde pública, infectando mundialmente mais de 200 milhões de pessoas em 74 países. No Brasil, onde há cerca de 10 milhões de infectados, a maior parte dos casos — entre seis a oito milhões — concentra-se na região Nordeste (BARRETO, 1993; ALVES et al., 1998).

Entre os fatores que contribuíram para propagação da esquistossomose estão os movimentos migratórios, a exploração inadequada de recursos hídricos, a distribuição ampla dos hospedeiros intermediários, a longevidade da doença e a falta de educação em saúde (RIBEIRO et al., 2004).

B. glabrata é um importante vetor do *S. mansoni* nas Américas, devido ao alto potencial biológico de infecção natural e vasta distribuição (SOUZA et al., 1995; BARBOSA et al., 2000). No Brasil, a dominância de *B. glabrata* abrange a região Nordeste, ao longo da faixa costeira e áreas interiores adjacentes dos estados do Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe até o sudeste da Bahia. Na região Sudeste, atinge parte de Minas Gerais, leste do Rio São Francisco, e o norte do Espírito Santo; existem, ainda, focos periféricos isolados deste molusco no Maranhão,

Pará, Goiás, São Paulo, Paraná (PARAENSE, 1972) e no Rio Grande do Sul (CARVALHO et al., 1998).

No estado de Pernambuco, a esquistossomose é historicamente endêmica na região rural (COUTINHO et al., 1997). A migração de trabalhadores rurais, aliada à gradual ocupação e modificação dos espaços urbanos, têm determinado a contínua expansão da esquistossomose e o estabelecimento de novos focos urbanos em Pernambuco (BARBOSA et al., 1998), Ceará (ALMEIDA et al., 1991), Minas Gerais (BARATA et al., 2000), Sergipe (SILVA et al., 2000) e São Paulo (LIMA, 1995).

Também vem se notando uma mudança no perfil epidemiológico da doença. Em áreas rurais, a esquistossomose se apresenta predominantemente sob a forma crônica, incidindo na classe social de baixa renda e tendo como vetor a *B. straminea* (BARBOSA et al., 2001). No litoral, a doença é representada por casos agudos em pessoas de classes média e alta, sendo o vetor a *B. glabrata* (BARBOSA et al., 2000).

As principais manifestações clínicas da esquistossomose ocorrem em menos de 10% da população infectada e estão caracterizadas por distúrbios intestinais, aumento do fígado, esplenomegalia e varizes esofagianas. A doença pode evoluir dependendo da intensidade da infecção, e diversos outros fatores podem conduzir ao sangramento gastrintestinal, ascite e anemia (XIMENES et al., 2000).

O controle da esquistossomose deve ser considerado sob dois aspectos, ou seja, morbidade e transmissão. Para o controle da morbidade, que visa diminuir o aparecimento de casos da forma grave, o diagnóstico e o tratamento são suficientes, apesar de que o sucesso da quimioterapia no tratamento da esquistossomose em áreas de alta prevalência não tem sido duradouro, havendo a rápida re-infecção. Em relação à transmissão, apenas o tratamento das populações infectadas não é suficiente sendo necessário também interromper o ciclo evolutivo do parasito. São medidas como obras de engenharia sanitária, possibilitando o aporte adequado de água para as casas e a adequada eliminação dos dejetos, impedindo que os mesmos contaminem os recursos hídricos, além de obras que modifiquem o meio ambiente. Outra medida importante é a educação, fazendo com que as populações residentes em zonas endêmicas não apenas tenham consciência do problema, mas que modifiquem o seu comportamento interrompendo o ciclo (KATZ, 1980).

2.2 Ciclo

O ciclo biológico de *S. mansoni* é compreendido por uma série de mudanças adaptativas (Figura 1). A transmissão do *trematóide* depende da presença do portador humano, eliminando ovos do parasito nas fezes; da existência de hospedeiro intermediário, o caramujo, e finalmente, do contato do homem com água contendo cercárias (REY, 2001).

O ciclo inicia-se com o caramujo que é o hospedeiro intermediário do *Schistosoma*, este invertebrado alberga o ciclo assexuado. Nos seus tecidos o *S. mansoni* multiplica-se originando os esporocistos, dando mais tarde origem à forma infectante ao homem, a cercária (NEVES, et al., 2005).

A infecção do hospedeiro definitivo ocorre quando o homem entra em contato com a água onde existem caramujos infectados liberando cercárias. Se estas larvas encontrarem o hospedeiro definitivo na água, penetram pela pele nua e intacta ou pelas mucosas. O parasito penetra nos tecidos até encontrar os vasos sanguíneos, seguindo pelas veias, passa pelo coração e atinge os pulmões, coração até atingirem o fígado. Lá ocorre o amadurecimento das larvas em formas sexuais adultas: macho e fêmea, e o acasalamento (forma sexuada). Após este acasalamento, os parasitas migram juntos, contra o fluxo sanguíneo (migração retrógrada), atingindo as veias mesentéricas e do plexo hemorroidário superior. Nessas veias, os parasitas põem milhares de ovos todos os dias, durante anos. Os ovos ao chegarem à luz do intestino são eliminados pelas fezes e em contato com a água, liberam os miracídios que nadam livres até encontrar um caramujo completando o ciclo (REY, 2001).

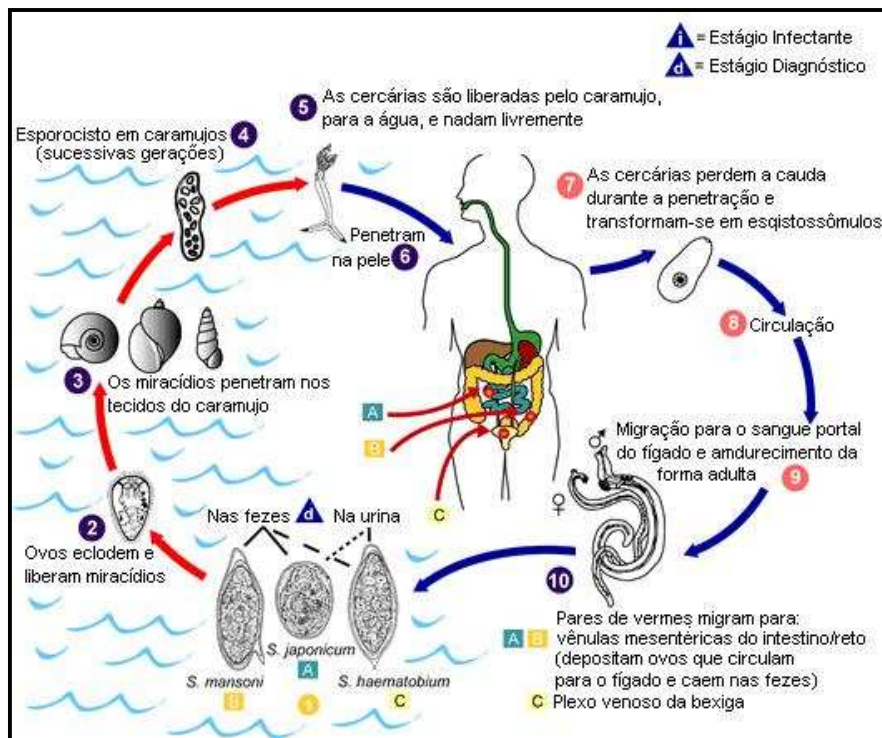


Figura 1 - Ciclo de vida de *Schistosoma* spp.
 Fonte: CENTERS FOR DISEASE CONTROL (2004).

2.3 Vektor

No ciclo de vida do *Schistosoma*, o hospedeiro intermediário (caramujo) exerce um papel fundamental na manutenção da parasitose (SCHNEIDER; ZELCK, 2001).

As espécies vetoras pertencem à ordem Pulmonata, subordem Basommatophora, família Planorbidae e compreendem apenas moluscos terrestres ou de água doce, sem opérculo que feche a concha quando o animal se retrai para dentro (REY, 2001).

Os planorbídeos habitam desde grandes lagos até pequenos córregos, brejos e poços rasos.

Ainda que a presença de planorbídeos possa ser freqüente em coleções naturais, sua densidade populacional costuma ser maior em criadouros artificiais, como canais, vala de drenagem pluvial, entre outros (REY, 2001).

Atualmente três espécies de moluscos planorbídeos transmitem, em condições naturais, o *S. mansoni* em nosso meio: *B. glabrata* (Figura 2), *B. tenagophila* e *B. straminea*. Destes, a *B. glabrata* é o mais suscetível dos hospedeiros intermediários no Brasil devido à sua distribuição e eficiência na transmissão da esquistossomose. Já a *B. tenagophila* possui distribuição ao longo da costa, desde o estado da Bahia até o Rio Grande do Sul. Por outro lado, a *B. straminea*, uma das mais adaptadas às variações climáticas, é encontrada em quase todas as bacias hidrográficas e apresenta uma alta resistência à infecção pelo *S. mansoni* (MARCHIORI, 1999).

O número de cercárias produzidas varia de acordo com a espécie de molusco hospedeiro, sendo muito alto em *B. glabrata*, que pode eliminar cerca de 1.000 a 3.000 cercárias de *S. mansoni* por dia e mais de 100.000 durante toda a vida do molusco. As espécies africanas de *Biomphalaria* produzem geralmente menos de 500 cercárias por dia (REY, 2001).



Figura 2 - *Biomphalaria glabrata*
Fonte: UNIVERSITÄT BIELEFELD (2006).

2.4 Morfologia do *S. mansoni*

2.4.1 Esquistossômulo

Logo quando a cercária penetra no hospedeiro definitivo, ocorrem algumas alterações estruturais, esta adaptação está relacionada à mudança do ambiente. Além da perda da cauda o trematóide forma rapidamente uma camada de microvilosidade sobre todo o tegumento, modifica a respiração (passando da forma aeróbica para anaeróbica), desenvolve uma sensibilidade à água e uma resistência ao sistema complemento, modifica ou altera o glicocálice e modifica a membrana trilaminar para a heptalaminar (STIREWALT, 1974). Toda essa adaptação estrutural dá origem a um outro estágio larval chamado de esquistossômulo.

Os esquistossômulos permanecem nos tecidos da derme por dois a três dias, ao fim dos quais se não forem destruídos pelo sistema imune do hospedeiro, acabam penetrando em um vaso cutâneo e é passivamente arrastado pela circulação em direção ao coração e pulmões. Após uma semana eles se localizam no sistema porta intra-hepático, onde pela primeira vez apresentam pigmento hemático no intestino, onde crescem e amadurecem até o final da quarta semana (REY, 2001).

2.4.2 Vermes Adultos

Contrariamente à generalidade dos trematódeos, apresentam-se como vermes dióicos e morfologicamente são delgados e longos (Figura 3) (NEVES et al., 2005).

O macho de *S. mansoni* mede cerca de 1,0 cm de comprimento e apresentam coloração branca. Na extremidade anterior traz uma ventosa oral afilada, e a pequena distância desta, uma segunda ventosa, o acetábulo. O curto segmento anterior compreendido entre as duas ventosas é cilíndrico e mais fino que o segmento posterior. Este é muito mais longo, achatado dorsoventralmente, porém enrolado de maneira a

formar uma calha ou tubo longitudinal conhecido como canal ginecóforo, pois nele costuma-se estar alojada a fêmea (REY, 2001).

A fêmea tem corpo cilíndrico, mais longo e mais fino que a do macho (1,2 a 1,6 cm de comprimento). Apresenta uma coloração escura e acinzentada devido à presença, no tubo digestivo, de um pigmento derivado da digestão do sangue (hemozoína). Possui duas ventosas pequenas, estando a ventosa acetabular, pedunculada, muito perto da oral (REY, 2001).

Como nos demais trematódeos, o revestimento externo dos vermes adultos é formado por uma citomembrana espessa que recobre o tegumento. Este é constituído por uma camada sincicial anucleada, mas que liga por pontes citoplasmáticas a células nucleadas, situadas mais profundamente (NEVES et al., 2005).

A superfície do tegumento exhibe grande quantidade de pequenos tubérculos, mas abundantes na superfície dorsal. Estruturas mais delicadas podem ser observadas com grande aumento, consistindo de minúsculos espinhos situados principalmente na superfície interna das ventosas assim como nos botões sensoriais (NEVES et al., 2005).

Logo abaixo do tegumento estão as camadas musculares da parede do corpo do helminto, responsáveis pela movimentação. Todo espaço interior entre os órgãos internos, é ocupado por um tecido denominado estroma, formado de células estreladas e lacunas cheias de um líquido intersticial (REY, 2001).



Figura 3 - Vermes adultos (Macho e Fêmea) de *S. mansoni*
Fonte: UNIVERSITÄT BIELEFELD (2006).

2.4.3 Ovo

As fêmeas põe cerca de um ovo por vez, e o total diário eliminado pelos vermes é em torno de 300 ovos. Este mede 110 a 180 μm de comprimento por 45 a 70 μm de largura. Apresenta um pólo anterior mais delgado e o posterior mais volumoso, com um espinho lateral saliente e agudo (REY, 2001).

Apresenta uma resistente casca dupla, a mais interna envolve o embrião (miracídio) (Figura 4). A expectativa de vida dos ovos maduros é de aproximadamente 20 dias e caso o miracídio não ecloda após três a quatro semanas, o mesmo morre dentro do ovo (NEVES et al., 2005).

O mecanismo de eclosão parece depender, sobretudo da hipotonicidade do meio, que promovendo a passagem da água para dentro da casca, determina aumento da tensão interna e sua ruptura.

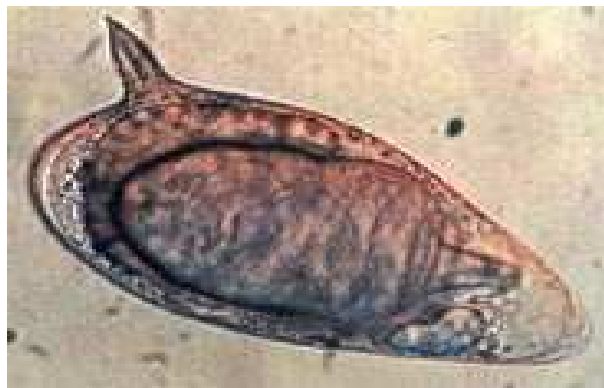


Figura 4 - Ovo de *S. mansoni*
Fonte: UNIVERSITY OF CAMBRIDGE (1998)

2.4.4 Miracídio

O miracídio de *S. mansoni* é o primeiro estágio infectante no complexo ciclo do parasito, e o futuro de todo este ciclo depende da capacidade desse estágio larval localizar e penetrar no hospedeiro invertebrado apropriado (PAN, 1980). Os miracídios

medem cerca de 160 por 60 μ m e estão revestidos por pequeno número de células epiteliais pavimentosas providas de numerosos cílios (REY, 2001).

De acordo com o estudo realizado por Pan (1980) a organização celular do miracídio apresenta-se dividida em oito categorias: a) sistema epitelial b) terebratório c) musculatura d) células intersticiais e) glândulas de penetração f) sistema excretório g) sistema nervoso h) células germinativas.

Na extremidade anterior do miracídio, abre-se um par de glândulas adesivas e uma glândula de penetração, todas unicelulares contendo no seu interior um material supostamente enzimático (PAN, 1980).

2.4.5 Esporocisto

Ao penetrar no interior do molusco, o miracídio perde seu revestimento epitelial ciliado, permanece nas proximidades do ponto de penetração e se transforma em uma estrutura sacular alongada. No oitavo dia a larva se apresenta com um tubo enovelado, imóvel e cheio de células germinativas em multiplicação e passa a ser denominado de esporocisto primário (REY, 2001).

No seu interior, as células germinativas vão se transformar em esporocistos de segunda geração, com a mesma arquitetura e por volta da segunda semana de existência mede 1,5 mm ele se rompe para liberar entre 20 e 40 esporocistos filhos (REY, 2001).

Os esporocistos secundários migram para o hepatopâncreas e o ovotesteis do molusco, onde continuam a crescer. Quando maduros, exibem na extremidade anterior uma protuberância móvel e um poro para eliminação de cercárias. O tempo necessário para a maturação dos esporos filhos e formação das primeiras cercárias é de 3 a 4 semanas, variando com a temperatura ambiente (REY, 2001).

De acordo com alguns trabalhos, depois de terem produzido cercárias por certo tempo, os esporocistos secundários podem voltar a formar uma terceira geração de esporocistos capaz de retomar a produção de nova geração de cercárias (NEVES et al., 2005).

Saindo do esporocisto, as cercárias ganham a hemocele que envolvem o hepatopâncreas e o ovotésteis, encaminham-se pela corrente circulatória e chegam a algumas áreas bem vascularizadas do tegumento. Aí provocam a formação de minúsculas vesículas na superfície externa, usando aparentemente o conteúdo de um par de glândulas unicelulares; e, ao romperem-se as vesículas saem para o meio exterior (REY, 2001).

2.4.6 Cercária

A cercária de *S. mansoni* é a fase evolutiva infectante especializada em executar as funções de locomoção, encontro do hospedeiro, invasão do mesmo e de maturar-se em vermes sexualmente maduros. Ela mede cerca de 500µm, mas pode variar consideravelmente devido a habilidade de contração e alongamento, Figura 5 (DORSEY et al., 2002).

Devido à capacidade da cercária de se contrair e estender longitudinalmente as células que a compõe não são estáticas e os processos citoplasmáticos estão, provavelmente, em um fluxo constante. De acordo com Dorsey et al. (2002) a capacidade da cercária de se alongar depende do tamanho da lâmina basal fibrosa. Ela apresenta um elevado volume de células musculares necessárias para o vigoroso movimento durante a natação, contração e extensão da cauda, corpo e ventosas.

Estruturalmente, a cercária de *S. mansoni*, apresenta-se dividida em: órgão anterior ou ventosa oral, segmento do corpo (com cutícula recoberta de espinhos) e cauda medindo cerca de 300 µm, terminando em uma bifurcação, Figura 5 (DORSEY et al., 2002; NEVES et al., 2005). Esta última região da cercária será perdida rapidamente no seu processo de penetração no hospedeiro definitivo.

O órgão anterior e o segmento do corpo da larva infectante de *S. mansoni* apresentam aproximadamente 0,5 µm de espessura (HOCKLEY, 1973), toda essa área é envolvida por duas camadas musculares. A larva apresenta uma membrana

superficial trilaminar de aproximadamente 7nm de espessura (VOGEL; MINNING, 1949; MORRIS, 1971).

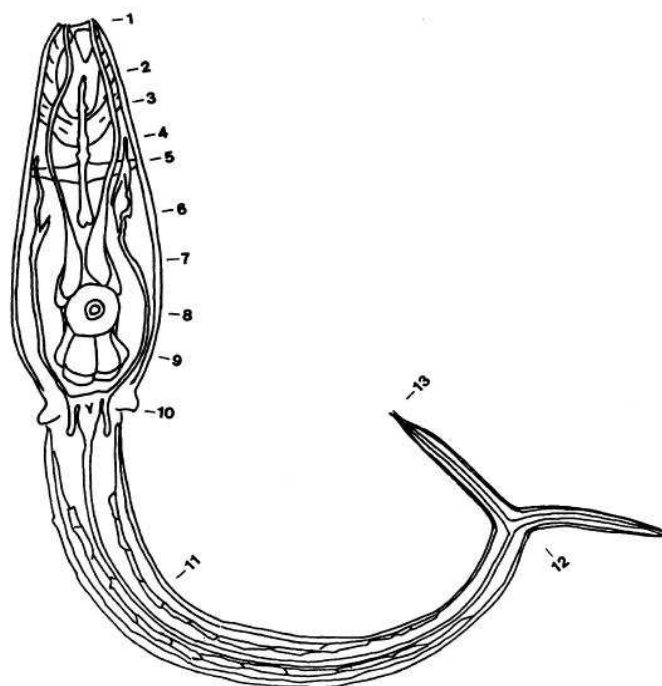


Figura 5 - Desenho esquemático da cercária de *S. mansoni*.

Fonte: Dorsey et al (2002).

Nota: 1-4 Órgão Anterior ou Ventosa Oral; 5-10: Corpo e 10-13: Cauda

2.4.6.1 Tegumento

A estrutura básica do tegumento é semelhante na cercária, esquistossômulo e vermes adultos (HOCKLEY, 1972). Ele é constituído por glicocálice (G), membrana superficial ou plasmalema externo do citoplasma sincicial (MS, à direita), citoplasma sincicial (CS), espinhos (SP, central), plasmalema sincicial interno (PSI), pericário (PK) e conexões citoplasmáticas (não mostrado), Figura 6 (STIREWALT, 1974).

A cercária jovem é coberta por um epitélio primitivo de 0,5 μ m de espessura. Este epitélio permanece até a fase embrionária e possui poucos núcleos e nenhuma junção celular é observada. Este tecido primitivo tem a função de proteger o tegumento

verdadeiro até que o mesmo esteja formado. No final da fase embrionária, o tegumento primitivo é completamente substituído por uma fina camada sincicial presente sob o epitélio. O desenvolvimento do tegumento é precedido pela perda gradual da maioria dos ribossomos e núcleos e o sincício se torna completamente preenchido por um material granular denso que está mais concentrado no corpo do que na cauda (HOCKLEY, 1972).

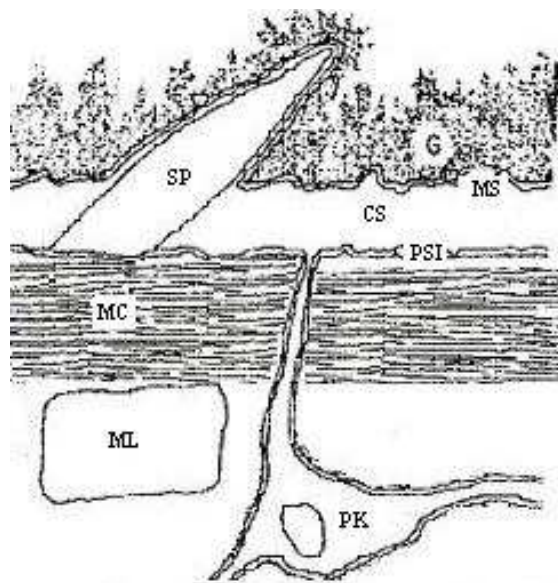


Figura 6 - Desenho esquemático do tegumento da cercária de *S. mansoni*.
Fonte: Adaptado de Stirewalt (1974).

Os SP aparecem no tegumento no mesmo momento do material granular, eles são cobertos pela MS, estão apoiados no PSI e se encontram completamente inseridos no tegumento (Figura 6).

De acordo com Morris (1971) os espinhos da cercária são menores que a dos adultos. Na cercária eles são mais numerosos no corpo, porém sua distribuição nesta área não é uniforme sendo maiores e mais concentrados na ventosa ventral e não estão presentes na região envolta da boca, extremidade oral, áreas ao redor da ventosa oral, nas papilas sensoriais (ROBSON; ERASMUS, 1970) e na região do pescoço (RACE et al., 1971).

Sob o tegumento da cercária encontram-se, consecutivamente, a lâmina basal e arranjo de músculos fibrosos circulares (MC) e longitudinais (ML) (HOCKLEY, 1972).

No CS estão presentes pequenas mitocôndrias espalhadas e corpos de inclusão. Estas inclusões podem apresentar formato esférico, alongado ou discóide e apresentam, em geral, uma região central eletrondensa e periferia translúcida. Esses corpos parecem originar-se do Complexo de Golgi nas células subtegumentares. A função desses corpos de inclusão está na formação da membrana heptalaminar externa (DORSEY et al., 2002).

O tegumento reveste toda a cercária com a camada citoplasmática e esta é contínua ao epitélio da cavidade oral, esôfago, sistema excretório e algumas porções de ductos excretórios (POWER; SOGANDARES, 1970).

Vários estudos mostraram que as cercárias que perdem o revestimento de superfície não sobrevivem na água (STIREWALT, 1963; BENNETT, 1963). De acordo com Bennett (1963) a camada superficial pode selecionar íons, por outro lado, Kent (1967) em seus experimentos concluíram que a camada de glicoproteína não permite a troca iônica. O autor sugere que esse revestimento pode atuar como um dispositivo de gel-filtração. Assim, a superfície cercarial pode simplesmente atuar como uma proteção mecânica evitando possíveis danos na superfície da cercária.

Analisando o tegumento utilizando o microscópio eletrônico de transmissão é possível observar uma camada de aproximadamente 0,5 μ m de espessura recobrendo a membrana superficial. Essa camada chamada de glicocálice (G) se apresenta perpendicular à superfície do tegumento e é composta por fibras ramificadas e interconectadas formando uma rede difusa (MORRIS, 1971; HOCKLEY, 1972; STEIN; LUMSDEN, 1973).

A origem do glicocálice tem sido bastante discutida, Rifkin (1970) encontrou em seus estudos que o glicocálice é formado no estado embrionário e é resultante de células esporocísticas. Porém, outros trabalhos revelaram que o glicocálice é uma parte integral da membrana externa do tegumento e é provavelmente produzido pelo tegumento, pelo fato de que algumas fibras que formam o glicocálice estarem firmemente inseridas na membrana externa do tegumento (KEMP, 1970; STEIN; LUMSDEN, 1973).

O glicocálice presente na cercária é bem diferente do esquistossômulo. Na cercária, ele está presente em toda a superfície e no esquistossômulo pode estar ausente, interrompido ou funcionalmente modificado, se tornando uma estrutura não-funcional (STIREWALT, 1974).

Apesar do papel do glicocálice não ter sido completamente elucidado, há uma grande variedade de possíveis funções para o mesmo como: adesão e lubrificação (KRUIDENIER, 1951), proteção contra adversidades do meio (KRUIDENIER, 1951, 1953a, 1953b; STIREWALT, 1963), controle da permeabilidade (MORRIS, 1971; STEIN; LUMSDEN, 1973) e adaptação fisiológica (KRUIDENIER, 1951; MORRIS, 1971).

2.4.6.2 *Musculatura*

A musculatura cercarial envolve os músculos circulares externos, uma ou mais camadas subjacentes de músculo longitudinais fibrosos, músculos fibrosos mais profundos orientados diagonalmente, musculatura cônica e oral da ventosa, músculos presentes ao redor de órgãos internos (como o trato digestivo e glândulas) e pequenas e discretas células musculares presentes no parênquima (KRUIDENIER; VATTER, 1960; DORSEY; STIREWALT, 1971; STIREWALT; DORSEY, 1973).

A musculatura do corpo difere da cauda em vários aspectos. Há usualmente apenas uma única camada de músculo longitudinal e circular no subtegumento do corpo, enquanto duas ou três miofibrilas podem constituir a camada longitudinal da cauda. Essas miofibrilas longitudinais parecem ser mais forte, compacta e contém mais miofilamentos na região caudal do que no corpo (STIREWALT; DORSEY, 1973).

2.4.6.3 Sistema Nervoso

O sistema nervoso do *S. mansoni* se torna mais complexo na medida que o parasito avança no estágio de miracídio e cercária até se tornarem vermes adultos (DEI-CAS et al. 1980).

O sistema nervoso da cercária é distribuído através dos três segmentos anatômicos da larva e consiste de papilas sensoriais, um gânglio central, dois pares de nervos centrais (um anterior e outro posterior) e doze nervos periféricos, distribuídos ao redor do gânglio (COUSIN;DORSEY, 1991), Figura 7.

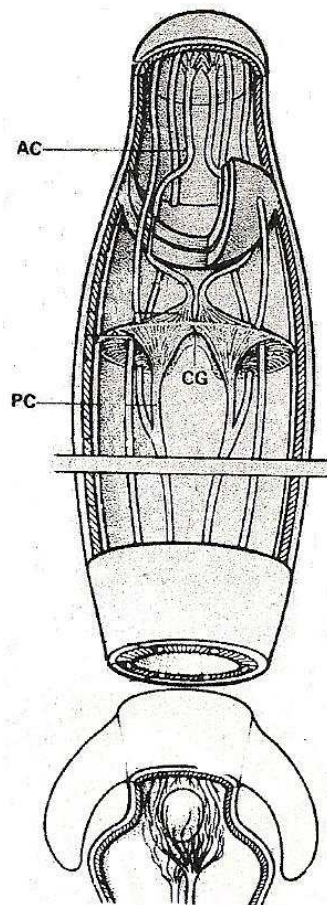


Figura 7 - Desenho esquemático do sistema nervoso da cercária de *S. mansoni*.
Fonte: Adaptação de Cousin e Dorsey (1991).

As papilas sensoriais estão conectadas a processos dentríticos, esses processos nervosos terminais estão localizados na superfície cercariana e fazem contato com o ambiente através de cílios ou aberturas no tegumento (DORSEY; COUSIN, 1986). De acordo com Short e Cartrett (1973) há aproximadamente 76 papilas, geralmente distribuídas bilateralmente e de forma simétrica em ambos segmentos do corpo e no órgão anterior. A maioria delas se concentra na porção oral e tendem a serem menos numerosos na cauda. A função da maioria das papilas ainda não é totalmente conhecida, mas pode estar envolvida na recepção de sinais fotoluminescentes, mecânicos e/ou químicos.

O gânglio central (CG) é uma estrutura bilobular e é o maior componente do sistema nervoso da cercária, o gânglio está localizado na área anterior do segmento do corpo próximo ao esôfago. Dele partem nervos periféricos que estão relacionados com a musculatura periférica do corpo e dois pares de nervos centrais. O par de nervo central anterior (AC) se localizam próximos a glândula acetabular indo em direção ao órgão anterior da cercária, seu papel está relacionado à musculatura dos ductos esofágicos e glândulas acetabulares. O par de nervos centrais posteriores (PC) projetam-se da área central do gânglio e estão associados à musculatura que envolve o sistema digestivo e ductos das glândulas acetabulares (COUSIN; DORSEY, 1991).

2.4.6.4 Sistema Digestivo

Existem, no sistema digestivo da cercária de *S. mansoni*, quatro regiões morfológicamente distintas: boca, cavidade oral, esôfago e ceco (EBRAHIMZADEH; KRAFT, 1969).

Embora exista um sistema digestivo, há várias razões para este trato ser considerado não-funcional como, por exemplo: a) não há evidências de ingestão oral, nem atividade peristáltica; b) ausência de glicogênio no intestino (AXMANN, 1947); c) nenhum desenvolvimento tem sido observado na cercária emergida.

2.4.6.5 Órgãos Secretores

A cercária possui um complexo sistema secretório e consiste de pelo menos três diferentes tipos de glândulas: as pré e pós-acetabulares e as glândulas da cabeça. Além das glândulas citadas, as cercárias antes de sair do caramujo, apresentam também glândulas de escape. Essas glândulas tem fundamental importância no processo de saída do caramujo e após a liberação do hospedeiro intermediário essas glândulas desaparecem (EBRAHIMZADEH, 1970).

As glândulas pré-acetabulares, pós-acetabulares e a glândula da cabeça diferem em localização, função, características histoquímicas, microscópica e ultra-estruturais (EBRAHIMZADEH, 1970; MORRIS, 1971; DORSEY; STIREWALT, 1971; STIREWALT; WALTERS, 1973).

A glândula pré-acetabular contém cálcio (STIREWALT; KRUIDNIER, 1961) e enzimas (STIREWALT, 1974). As enzimas provavelmente estão relacionadas com a degradação do tecido do hospedeiro auxiliando durante a penetração e migração dos esquistossômulos (STIREWALT, 1974). Outro possível papel da secreção da glândula pré-acetabular é na transformação da cercária em esquistossômulo (GAZZINELLI et al., 1973).

A glândula pós-acetabular produz secreção que apresenta várias funções, entre elas, a adesão da cercária à superfície do hospedeiro (STIREWALT, 1966; STIREWALT; DORSEY, 1974), o muco produzido pode ser um importante fator na transformação da cercária em esquistossômulo além de estar relacionado com a proteção da mesma (STIREWALT; WALTERS, 1973). Com exceção da função adesiva, as outras funções mencionadas anteriormente são apenas especulativas.

A glândula da cabeça é um órgão encontrado tanto na cercária como no esquistossômulo (MORRIS, 1971), ela apresenta forma irregular com vários corpos de inclusão (delimitados por membrana) de diferentes eletrondensidades. Ela está localizada na região anterior da cercária e consiste em um fundo que se afila em um sistema de ductos múltiplos que se abrem no tegumento da ventosa oral. De acordo com Morris (1971) a glândula da cabeça libera grânulos, através dos ductos, em direção

ao tegumento na extremidade anterior da ventosa oral. Esses grânulos secretrórios provavelmente fornecem material para reparo e reorganização do tegumento da ventosa oral danificada após a penetração, contribuindo dessa forma, no desenvolvimento da cercária até o esquistossômulo, já que o processo de penetração pode ser destrutivo (DORSEY, 1976).

2.4.6.6 Sistema Excretório

Este sistema compreende as células flama periféricas, túbulos coletor primário e secundário, um par de tubos coletores principal no corpo e um tubo simples na cauda, bexiga excretória, átrio e poros excretórios, Figura 8 (GORDON et al., 1934; KUNTZ, 1950; KRUIDENIER, 1959; EBRAHIMZADEH; KRAFT, 1971; MEULEMAN, 1972).

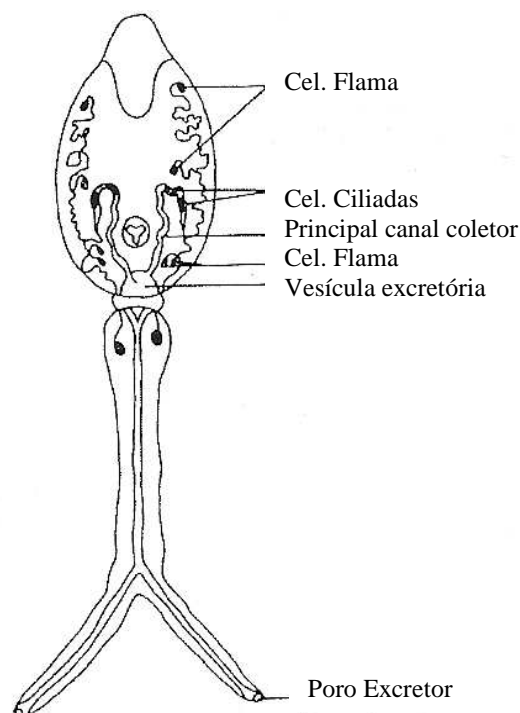


Figura 8 - Desenho esquemático do sistema excretório da cercária de *S. mansoni*
Fonte: GORDON et al. (1934).

O desenvolvimento do sistema excretório inicia no embrião e surgem a partir de uma massa oval de células (CHENG; BIER, 1972).

A ultra-estrutura da cercária de *S. mansoni* tem sido bem abordada resultando no acúmulo de muitas informações (DORSEY et al., 2002), porém, apesar de ser bastante importante correlacionar morfologia com composição química, a abordagem citoquímica é ainda pouco explorada. A organização da cutícula do parasito e sua composição bioquímica são de extrema importância para o entendimento do desenvolvimento do parasito no hospedeiro devido a sua intrínseca relação com o processo imune do hospedeiro. Estudos da composição química celular e dos processos biológicos em nível molecular que ocorrem no interior dos parasitas, podem ser a chave para o controle e eliminação das parasitoses. Sendo assim, as técnicas citoquímicas utilizadas para microscopia eletrônica são de grande importância devido ao conhecimento e localização de moléculas presentes nos parasitos e suas relações nos sistemas biológicos, levando a um melhor entendimento da relação parasito-hospedeiro.

2.5 Citoquímica

Através de uma caracterização citoquímica é possível identificar a composição bioquímica de um determinado sistema biológico e através da associação dessa técnica à ultra-estrutura possibilita a identificação “in loco” de proteínas, carboidratos, lipídios entre outros, permitindo não só a identificação como também a localização e quantificação desses compostos (SOUZA, 1998).

2.5.1 Localização de Lipídios Saturados

A composição lipídica de helmintos parasitas tem sido alvo de inúmeros estudos, particularmente pelo fato deste elemento contribuir para sua proteção contra condições

desfavoráveis do meio (PEIXOTO et al., 1994; ARAÚJO et al., 1995), e ainda por serem utilizados como moléculas de reserva energética, comunicação entre células e por serem componentes estruturais das mesmas (BRADSHAW; WALKER, 2005).

Os esteróis de membranas podem ser detectadas por meio de um antibiótico poliênico filipina. A filipina se liga ao colesterol e outros β -hidroxi-esteróis, formando complexos filipina-colesterol. A ligação pode ser vista através de criofratura, MET transmissão e varredura. O aspecto ondulado da marcação é característico da presença de complexos filipina-esterol (SOUZA, 1998).

2.5.2 Localização de Lipídios Insaturados

A técnica citoquímica que permite a identificação de lipídios insaturados é a técnica do tampão imidazol. Que através do complexo ósmio-imidazol facilita a interação da molécula do tetróxido de ósmio com os lipídios insaturados, contrastando fortemente as inclusões lipídicas. A rápida penetração nos tecidos e membranas celulares e o aumento no contraste são devidos ao tampão utilizado na técnica (SOUZA, 1998).

2.5.3 Localização de Partículas Carregadas Negativamente

Uma das formas de avaliar a natureza protéica da superfície dos parasitas têm sido a utilização de partículas ligantes carregadas positivamente como a ferritina (SOUZA et al., 1989; SOUZA, 2005).

O desenvolvimento da larva infectante de alguns helmintos parasitas é acompanhada por mudanças na sua superfície (PROUDFOOT et al., 1993a, 1993b) e foi sugerido que essas mudanças talvez sejam um sinal da progressão do

desenvolvimento ou uma adaptação para invadir o tecido que envolve o hospedeiro (AKHKHA et al., 2004).

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

2.5.4 Localização de Cálcio

Como os íons de cálcio desempenham papel de muita relevância em uma série de atividades celulares, entre elas a contração muscular, o movimento de cílios e flagelos, fenômenos de despolarização e secreção, ativação de microtúbulos e microfilamentos, endocitose e exocitose, entre outras, é de grande interesse a localização precisa na célula, bem como organelas envolvidas no seqüestro deste íon (SOUZA, 1998).

Quando se tem por objetivo localizar sítios celulares que contenham cálcio pode-se utilizar a técnica do piroantimoniato de potássio (SPICER et al., 1968), a técnica de Oschman e Wall (1972) e a técnica de Hepler (1980) que utiliza o CaCl_2 no glutaraldeído e a pós-fixação com tetróxido de ósmio com ferricianeto de potássio.

2.5.5 Localização de Proteínas Básicas

As proteínas constituem uma importante classe entre os componentes químicos presentes na célula por desempenhar uma série de funções essenciais, entre as quais constituir o principal elemento estrutural, enzimas e encontrar-se associado a outros elementos importantes tais como lipídios, carboidratos, ácidos nucléicos, dentre outros.

A sua identificação e precisa localização permite que se conheça melhor os mecanismos e função de determinado tipo e/ou estrutura celular. Desse modo, atualmente a citoquímica tem auxiliado a identificação de proteínas (SOUZA, 1998).

A localização de proteínas pode ser feita através de tratamentos enzimáticos ou através de técnicas específicas para reconhecimento de determinada classe de proteínas como as básicas. Uma das proteínas básicas mais importantes são as histonas que desempenham um importante papel e se encontram comprometidas numa série de funções celulares tais como a diferenciação celular e a regulação da função gênica de células eucarióticas (SOUZA, 1998).

Para a detecção de proteínas básicas em nível ultra-estrutural são utilizadas principalmente, em citoquímica duas técnicas: a do PTA e a prata amoniacal. De acordo com vários estudos aplicando-se as técnicas de prata amoniacal e do PTA em diferentes tipos celulares, verificou-se que possuem especificidades diferentes, o PTA revela proteínas ricas em histidinas e a prata amoniacal, arginina e lisina (SOUZA, 1998).

3 - JUSTIFICATIVA

A esquistossomose constitui um dos mais graves e complexos problemas de saúde pública em nosso território devido à falta de uma vacina, às falhas na tentativa de erradicar o molusco vetor e ao desenvolvimento de resistência do parasita às drogas anti-esquistossomóticas (KALIFE et al., 2000).

Apesar de um século da sua descoberta e do grande número de pesquisas desenvolvidas, a esquistossomose atinge 74 países, envolvendo milhões de pessoas em países latino-americanos e africanos (MALAGUEÑO; SANTANA, 1994; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 1998).

No Brasil, a esquistossomose apresenta ampla distribuição e em Pernambuco, a doença é historicamente endêmica na região rural apresentando, dos seus 115 municípios, 82 deles endêmicos para esta parasitose (COUTINHO et al., 1997; FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2001).

Mesmo com empenho de muitos pesquisadores e instituições de pesquisa de várias partes do mundo, na busca de um possível controle, esta parasitose continua em franca expansão. Apesar de vários trabalhos relacionados ao estudo da fase parasitária responsável pela infecção, a cercária, nenhum deles enfocou a caracterização citoquímica em nível ultra-estrutural.

Uma alternativa para identificar a base de processos críticos necessários ao estabelecimento do parasita no hospedeiro é focar o estágio responsável pela invasão primária, ou seja, o estágio infectante. Para isso, se faz necessária uma análise citoquímica em nível ultra-estrutural para que se possa obter dados que certamente deverão ser utilizados para o melhor entendimento da biologia do parasito bem como esclarecer a intrigante relação parasito-hospedeiro.

Além disso, pelo fato da organização bioquímica da larva infectante de *S. mansoni* estar relacionada com a sua funcionalidade a caracterização citoquímica pode ser empregada para diferenciar cepas. Compreendendo melhor a composição bioquímica é possível entender que características da larva infectante podem contribuir para existência de cepas mais virulentas que outras.

4 - PERGUNTA CONDUTORA

Como estão distribuídos alguns componentes bioquímicos na cercária de *Schistosoma mansoni*?

5 - HIPÓTESE

A distribuição de alguns componentes bioquímicos na cercária de *S. mansoni* está provavelmente relacionada com a função infectante da larva.

6 - OBJETIVOS

6.1 Geral

- a) Caracterizar ultra-estruturalmente alguns componentes bioquímicos da cercária de *S. mansoni* utilizando técnicas citoquímicas.

6.2 Específicos

- a) Caracterizar ultra-estruturalmente o tegumento da cercária de *S. mansoni*;
- b) Identificar a presença e localização de lipídios saturados e insaturados;
- c) Identificar a localização de proteínas básicas através das técnicas de PTA e prata amoniaca;
- d) Localizar sítios celulares de cálcio na larva de *S. mansoni*;
- e) Investigar a presença de sítios aniônicos e caracterizar proteínas envolvidas na carga através do tratamento enzimático.

7 - MATERIAIS, MÉTODOS E RESULTADOS

Esta dissertação resultou em dois artigos. Cada um deles com sua metodologia própria e resultados referentes aos objetivos específicos.

ARTIGO 1 -



Cytochemical characterization of lipids in the cercaria of *Schistosoma mansoni*

Journal:	<i>Parasitology</i>
Manuscript ID:	draft
Manuscript Type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Cavalcanti, Marília; Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Parasitologia Araújo, Helena; Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Parasitologia Paiva, Marcelo; Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Entomologia Barbosa, Constança; Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Parasitologia Nascimento, Robson; Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Parasitologia Lima-Filho, José; Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, LIKA Brayner, Fabio; Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Parasitologia Alves, Luiz; Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Parasitologia; Universidade de Pernambuco, Parasitologia; Faculdade São Miguel, Imunologia; Faculdade de Ciências Humanas da Olinda, Imunologia
Key Words:	<i>Schistosoma mansoni</i> , Cercaria, Ultrastructure , Cytochemistry, Lipids

Cytochemical characterization of lipids in the cercaria of *Schistosoma mansoni*

Cavalcanti, M. G. S; Araújo, H. C. R; Paiva, M. H. S. Barbosa, C. C. G. S.; Nascimento, R.C.;

Lima-Filho, J. L.; Brayner, F. A; Alves, L. C.

Departamento de Parasitologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (FIOCRUZ), Recife - PE, Brazil.

Departamento de Entomologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (FIOCRUZ), Recife - PE, Brazil.

Laboratório de Imunopatologia Prof^o. Keizo Asami (LIKA) da Universidade Federal de Pernambuco, Recife - PE, Brazil.

Faculdade São Miguel, Recife - PE, Brazil.

Faculdade de Ciências Humanas de Olinda (Facho), Olinda -PE, Brazil

Universidade de Pernambuco (UPE), Recife - PE, Brazil.

Corresponding author:

Marília Gabriela dos Santos Cavalcanti

Department of Parasitology

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ FIOCRUZ

Av. Moraes Rego s/n, Campus da UFPE

CEP 50670-420, Recife, Pernambuco - Brazil.

E-mail address: marilia@cpqam.fiocruz.br

Phone: +55 81 21012643

Fax: +55 81 34532449

Abstract

Lipidic composition of nematodes has been the objective of several studies, mainly because this element contributes to protection against unfavorable environment condition, as energetic storage, communication between cells and for being part of its structural component. The objective of the present study was to identify, by using ultrastructural cytochemistry, the presence and localization of saturated and insaturated lipids in *Schistosoma mansoni* cercariae. For the saturated and insaturated lipid detection, it was used, respectively, filipin and imizadol techniques. It was observed by transmission microscopy the presence of cholesterol in tegument limiting the larva inner spaces. Such stain was extremely evident in the muscle tissue of infecting larvae. By transmission and scanning microscopy, we evidenced the presence of triglycerides and its sterols, in a globular format, in all external regions of the infecting larva, as well as in others structures. The lipid localization in the external region of the larvae may serve as a facilitator agent in the host approximation. Besides, it may be related to the larvae protection against external environment adversities (in the water and after the penetration in the definitive host); possess a hydrostatic role and helping in the larvae locomotion decreasing the attrict with the aquatic environment.

Keywords: *Schistosoma mansoni*, cercaria, ultrastructure, cytochemistry, lipids.

Introduction

Schistosomosis is a disease spread worldwide, and representing in 3rd world countries, one of the most important helminth infections. It is estimated that this disease affects more than 200 million people living in tropical and sub-tropical countries. The severity and organic deficit produced by such parasites makes this illness the most important tropical disease behind malaria (WHO, 1998).

Cercaria represents the *Schistosoma mansoni* infecting stage, producing effects to the host by penetrating skin and mucosal. This early stage is programmed to exist for only a short period in the water and being specialized in executing locomotion functions, finding the host, invading it and turning into sexually matured worms (Dorsey et al., 2002).

The ultrastructure of *S. mansoni* cercariae has been examined for many years, resulting in an accumulation of information, however, the majority of such studies is concentrated in organs and systems or in larvae limited areas, such as tegument (Dorsey et al 2002).

Based on the evolution of this early stage to adult worms, the study of cercariae may be understood as an investigation about the premature adult stage, because cercariae germinal line cells will originate several worm organs (Dorsey et al., 2002).

The composition of nematode lipids, mainly the parasite ones, has been the objective of many studies, particularly by the fact that this element contributes to its own protection against unfavorable environment conditions (Peixoto et al., 1994; Araújo et al., 1995), and still for being used as energetic storage molecules, communication between cell and for being structural components of such nematodes (Bradshaw and Walker, 2005).

1
2
3
4
5
6 Two lipid types may be detected by Transmission Electronic Microscopy (MET):
7
8 esterols and storage lipids. Membrane esterols can be identified by polienic antibiotics. The
9
10 filipin attaches to cholesterol and other β -hidroxi-esterols, forming multimolecular
11
12 complexes (filipin-cholesterol) that can be recognized by transmission microscopy (De
13
14 Souza, 1998).
15
16

17
18 Triglycerides accumulate in the cell cytoplasm under the shape of lipid inclusion.
19
20 After the routine fixation for MET, such inclusions present as circular structures, with a
21
22 homogenous matrix and the increase in contrast are due to the imidazol buffer used in this
23
24 technique (De Souza, 1998).
25
26

27
28 Although *S. mansoni* lipids have been quantified by Allan et al. (1987) and Furlong
29
30 and Caulfield (1988), no study has yet identified the localization “in locus” of such
31
32 components.
33

34
35 The objective of the present study is to characterize the saturated and insaturated
36
37 lipids of *S. mansoni* larvae and from such data, correlate it to the localization of such
38
39 constitutive with its function.
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Materials e Methods

Cercariae: Infected *Biomphalaria glabrata* snails were submitted to an aquatic environment, under artificial light at 28 °C for 30 minutes, until cercariae release whose strain is from Belo Horizonte – Brasil. The next step was the determination of parasitemic load in order to perform experiments.

Transmission Electron Microscopy (TEM), Routine (DE SOUZA et al., 1989): Samples were fixed in a 2.5% glutaraldehyde solution, 4% paraformaldehyde, 5mM CaCl₂ in 0.1M cacodylate buffer (pH 7.2), for two hours at room temperature, washed in the same buffer and postfixed in 1% OsO₄ in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2), for one hour. After postfixation, samples were washed in the same buffer, counterstained in block with uranyl acetate, once again washed and dehydrated in increasing series of acetone. The material was infiltrated and embedded in Epon resin.

Scanning Electron Microscopy (SEM): Cercariae were washed and fixed in 2.5% glutaraldehyde solution in 0.1M cacodylate buffer (pH 7.2), for two hours at room temperature. Later on, samples were postfixed in 1% OsO₄ in the same buffer, for one hour. Samples went through the critical point and, subsequently labeled with gold particles and finally observed in scanning microscopy, Jeol.

Cytochemistry

Imidazol (TEM): For lipid detection, cercariae were fixed in a 2.5% glutaraldehyde solution and 2.5% paraformaldehyde in 0.1M cacodylate buffer (pH 7.2), samples were

1
2
3
4
5
6 washed with the same buffer and then washed in 0.1M imidazol buffer (pH 7.2), cercariae
7
8 were postfixed in a solution containing 2% OsO₄ in 0.1M imidazol buffer, dehydrated in
9
10 acetone and embedded in Epon 812. Ultrathin sections were collected and visualized by
11
12 TEM, with no counterstain.

13
14
15 For the control group, all steps above mentioned were made, except the imidazol
16
17 buffer incubation.

18
19
20
21
22 **Imidazol (SEM):** For lipid detection using scanning electron microscopy, cercariae were
23
24 processed for the imidazol technique (above described), later on postfixed, washed and
25
26 dehydrated in ethanol. Samples went through point and metalized in gold before analysis.
27
28

29
30
31 **Filipin (TEM):** Cercariae were fixed for two hours in 2.5% glutaraldehyde solution and
32
33 0.1M cacodylate buffer (pH 7.2), later on the material was fixed and washed in the same
34
35 buffer, incubated for 60 minutes at room temperature in filipin solution, washed in 0.1M
36
37 cacodylate buffer (pH 7.2), postfixed for one hour (1% OsO₄ in 0.1M cacodylate buffer)
38
39 and subsequently washed in the same buffer. The material was dehydrated in acetone (30,
40
41 50, 70, 90, 100, 100, 100%), embedded in Epon, sectioned and counterstained in uranyl
42
43 acetate and lead citrate. Alternatively, it is also possible to incubate the material with filipin
44
45 during fixing procedure. In this study, the material was fixed for one hour at room
46
47 temperature, with 2.5% glutaraldehyde solution and 0.1M cacodylate buffer (pH 7.2),
48
49 containing 50µg/ml filipin.
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Results

General morphology

Using the routine procedure, *S. mansoni* cercariae were analyzed by Transmission Electronic Microscopy (Fig.1 A-B).

By transversal cut, we were able to detect the presence of spikes in the body's tegument and in the tail. Over the tegument, we evidenced the presence of basal lamina, circular muscle and longitudinal. Inclusion bodies were identified in the sincicial cytoplasm and presented itself in different shapes and electron-densities. In some of those inclusion bodies, we could observe a higher electron-density in the inner periphery.

7.2 Localization of saturated lipids

The presence of a filipin-sterol complex in the circular muscles was observed after the use of the filipin technique (Fig 2 A-D). Besides the muscular stain, we have identified a reaction well-distributed delimiting some compartments of the infecting larvae. The reaction was also observed in the nuclear membrane of subtegument-cells.

Although we have used two variations of the filipin technique (incubation of the filipin in the fixing solution or after fixing it), we achieved the same results following the two methodologies. However, the material processed using the filipin in the fixation showed itself less preserved.

Localization of insaturated lipids

In our studies, using transmission electronic microscopy, was identified insaturated lipids in the *S. mansoni* cercariae using the imidazol buffer. We observed such lipids in

1
2
3
4
5
6 globular shape in all external regions of the infecting larvae (Fig.3A). It was also evidenced
7
8 that such insaturated material was attached to the surface by a ligament, and the stain
9
10 pattern shows the presence of lipid in its constitution (Fig.3B). Besides the external region,
11
12 there was a stain in all cercaria tegument (Fig.3 A-C).
13
14

15
16 Regarding to the inner region of the larvae, it was observed the presence of
17
18 insaturated lipids in the head gland (not shown), pre-acetabular gland (not shown) and
19
20 inclusion bodies (Fig.3D).
21

22
23 Using the scanning microscopy, we also observed a globular stain pattern
24
25 distributed in the cercaria surface (Fig.4 D-F). This stain was evident in all body and tale of
26
27 the infecting larvae, being more evident in the two ventral suckers of the larva.
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Discussion

The presence of lipids in nematodes has brought many questions due to its innumerable functions that such component can perform.

Although the Z line is a prominent entity from the striated muscle, its composition and function during the contraction remains unknown. The stain of the Z line after processing by the filipin technique indicates the presence of lipids as cholesterol and its esters in this structure. Such results are in accordance to the observation of Garamvolgyi (Garamvolgyi, 1965, 1968 ; Harsanyi and Garamvolgyi, 1969), which after the removal of the Z line with pancreatic lipase of insect muscles and rabbit skeletal muscle, suggested that this line may contain besides proteins, lipidic components.

The technique used to detect insaturated lipids was the imidazol buffer, which applies the osmium-imidazole complex. By using this technique it was possible to evidence that some *S. mansoni* cercaria treated with imidazol buffer presented a strong stain in all parasite surface. The use of a higher increase showed that the surface lipidic material is connected to the larvae by a material that contains in its composition insaturated lipids, however, with a different electrodensity.

According to Shiff et al. (1972), lipids presented in the human host skin influenciate the *S. mansoni* and *S. haematobium* cercariae during the penetration. According to this author, the infecting larva is stimulated by the presence of fatty acids displayed on the host surface. Similarly, Stirewalt (1966) evidenced the importance of the host lipids as a stimulus to the cercaria penetration.

With the presence of insaturated lipids on the cercaria surface, it is possible this lipidic material works as a facilitator agent bringing the host closer, since the host also presents lipids on its surface.

1
2
3
4
5
6 Although the ultra-structural localization of insaturated lipids, our study did not
7 clarify where such components came from. However, considering that cercariae were
8 obtained a few hours after freed from the snail, it is possible that some insaturated lipids
9 evidenced by the imidazol buffer were from the invertebrate host. Therefore, our results
10 are in agreement with Ivanov (1950), which indicated thta the lipids presentes in the
11 cercaria body are synthesized from the fat absorbed from the intermediate host. Faust
12 (1917) elucidated experimentally the presence of lipids in the cytoplasm of the
13 hepatopancreas of infected snail. The results obtained by Faust were confirmed by Hurst
14 (1972) which also demonstrated a discrete increase of the lipidic material in *Physa*
15 *occidentalis* infected with *Echinostoma revolutum*.
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28

29 Another possible function for the presence of lipidic small globules in the cercaria
30 surface is the possible correlation of the larvae protection to the external environment
31 adversity.
32
33
34

35
36 Considering that cercariae need to swim in order to reach the host, the presence of
37 insaturated lipids on its surface may influence the movement of the infecting larva since the
38 polar interaction of the water with apolar (lipid) allows a better slide of the cercaria in the
39 aquatic solution. This would be energetically in favor since the atrict with the water would
40 be reduced.
41
42
43
44
45
46
47

48 According to Ginecinskij (1961), the lipid presented in nematodes can also play a
49 hydrostatic role, because it reduces the body weight. The same author has also shown that
50 non-swimmer species did not present lipid, however small amounts could be observed in
51 sliding-species and a quite large amount in those species with swimming characteristics.
52
53
54
55

56
57 As previously established, it is known that cercariae do not feed in aquatic
58 environments and, it is possible that the energy storage may be correlated to the lipids. In
59
60

1
2
3
4
5
6 our study, as lipids were also found inside the infecting larva, such components may be
7
8 related to the energy storage after freed from the snails. Ginecinskij (1961), studying other
9
10 species as *Opisthioglyphae ranae*, *Cotylurus brevis* and *Cercaria spinulosa*, observed that
11
12 lipids are completely consumed during the larva get around and only *Cercaari helvetica*
13
14 presented a lipid decrease. In this study, the author has also observed that there is no lipid
15
16 stored in cercaria which do not swim and there is a quite higher amount in active
17
18 cercaria, suggesting, therefore, a relation between the degree of activity and storage lipids.
19
20
21

22 The instaturated lipids were evidenced in the tegument, head gland, pré-acetabular
23
24 gland and inclusion bodies. One of the possible functions of the head gland is to provide
25
26 material to repair and reorganize the oral sucker tegument after the host penetration
27
28 (Hockley and McLaren, 1973). As we observed the presence of lipid material in the head
29
30 gland, it is possible that among repairing components insaturated lipids may be present.
31
32
33

34 The “*in locus*” localization of saturated and insaturated lipids provides solid
35
36 information to a better understanding over the functional role of these components in the
37
38 infecting larva. The information obtained in this study will, doubtless, be a useful tool in
39
40 designing more specific control methods against this *S. mansoni* stage.
41
42
43
44
45
46
47
48
49

50 **Knowledments**

51 This study was developed in the Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação
52
53 Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Conselho Nacional Científico e Tecnológico (CNPq) e
54
55 Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami.
56
57
58
59
60

Referências

Allan, D., Payares, G. and Evans, W. H. (1987) The phospholipid and fatty acid composition of *Schistosoma mansoni* and of its purified tegumental membranes. *Molecular and Biochemical Parasitology*. Mar, **23**, 123-8.

Araujo, A. C. G., Fliqueiredo-Silva, J., Souto-Padron, T., Dreyer, G., Norões, J. and De Sousa, W. (1995) Scanning electron microscopy of adult *Wuchereria bancrofti* (Nematoda: Filarioidea), *Journal of Parasitology*, **81**, 3, 468-474,.

Bradshaw, H. B. and Walker, J. M. (2005) The expanding field of cannabimimetic and related lipid mediators. *British Journal of Pharmacology*, **144**, 459–465.

De Souza, *Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicada às ciências biológicas*, Sociedade Brasileira de Microscopia, 179f, 1998.

Dorsey, C. H., Cousin, C. E., Lewis, F. A. and Stirewalt, M. A. (2002) Ultrastructure of the *Schistosoma mansoni* cercaria.; **33**, 3, 279-323, *Micron*.

Faust, E. C. Life-history studies on Montana trematodes . *III Biol. Monogr*, v. 4, p. 1-121, 1917.

1
2
3
4
5
6
7
8 **Furlong, S. T. and Caulfield. J. P.** (1988) *Schistosoma mansoni*: sterol and phospholipid
9 composition of cercariae, schistosomula, and adults. *Experimental Parasitology*. Apr, **65**, 2,
10 222-31.
11
12
13
14

15
16
17 **Garamvolgyi, N.** (1965) . The arrangement of the myofilaments in the insect flight muscle
18 I. *Journal of Ultrastructure Research*, **13** :409 .
19
20
21

22
23
24 **Garamvolgyi, N.** (1968) . On the role of the Z-lines in the insect flight muscle . *Acta*
25 *Biochemistry Biophys.* **3** :77 .
26
27
28

29
30
31 **Ginecinskij, T. A.** (1961) The dynamics of the storage of fat in the course of the life cycle
32 of trematodes. *Dokl. Akad. Nauk. SSSR*, **139**, 1016-1019.
33
34

35
36
37 **Harsanyi, V., and Garamvolgyi, N.** (1969) . On the Z-substance of striated muscle. *Acta*
38 *Biochemistry Biophys.* **4**, 259 .
39
40
41

42
43
44
45 **Hockley, D. J. and McLaren, D. J.** (1973). *Schistosoma mansoni*: changes in the outer
46 membrane of the tegument during development from cercaria to adult worm. *International*
47 *Journal for Parasitology* Jan; **3** , 13-25.
48
49
50

51
52
53
54 **Hurst, C. T.** (1927).Structural and functional changes produced in gartropod mollusk,
55 *Physa accidentalis*, in the case of parasitism by the larvae of *Echinostoma revolutum*, *Univ.*
56 *Cal, Pibl. Zool.*, **29**, 51-57.
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9 **Ivanov, I. I.** (1950) On the byochemistry of the muscular apparatus of helminths. *Trusdy*
10 *Vsesoiuz. Inst. Gel'mint*, **4**, 51-57.

11
12
13
14
15 **Peixoto, C.A., Martinez, A.M.B., Souza, M.F. and De Souza, W.** (1994) *Caenorhabditis*
16 *elegans* and *Strongyloides venezuelensis* ultrastructural visualization of lipids in the cuticles
17 of adults and larvae forms (Nematoda: Rhabditoidea), *Acta Tropica*, **3**, 1, 107-115,.

18
19
20
21
22
23
24 **Shiff, C. J. , Cmelik, S. H., Ley, H. E. and Kriel, R. L.** (1972) The influence of human
25 skin lipids on the cercarial penetration responses of *Schistosoma haematobium* and
26 *Schistosoma mansoni*. *Journal of Parasitology*. Jun; **58** (3):476-80.

27
28
29
30
31
32
33 **Stirewalt, M. A.** (1966) Skin penetration mechanisms of helminths. In E.J.L.Soulsby (ed).
34 *Biology of Parasites*. Academic Press. Penetration stimuli for schistosome cercariae. In
35 T.C. Cheng. The biology of symbiosis.

36
37
38
39
40
41
42 **World Health Organization** (1998) – *Report of the WHO informal consultation on*
43 *schistosomiasis control*. Geneva, Switzerland. Document WHO/CDS/CPC/SIP/99.2.

44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure 1

Tegument of Cercaria of *S. mansoni*
Routine procedure

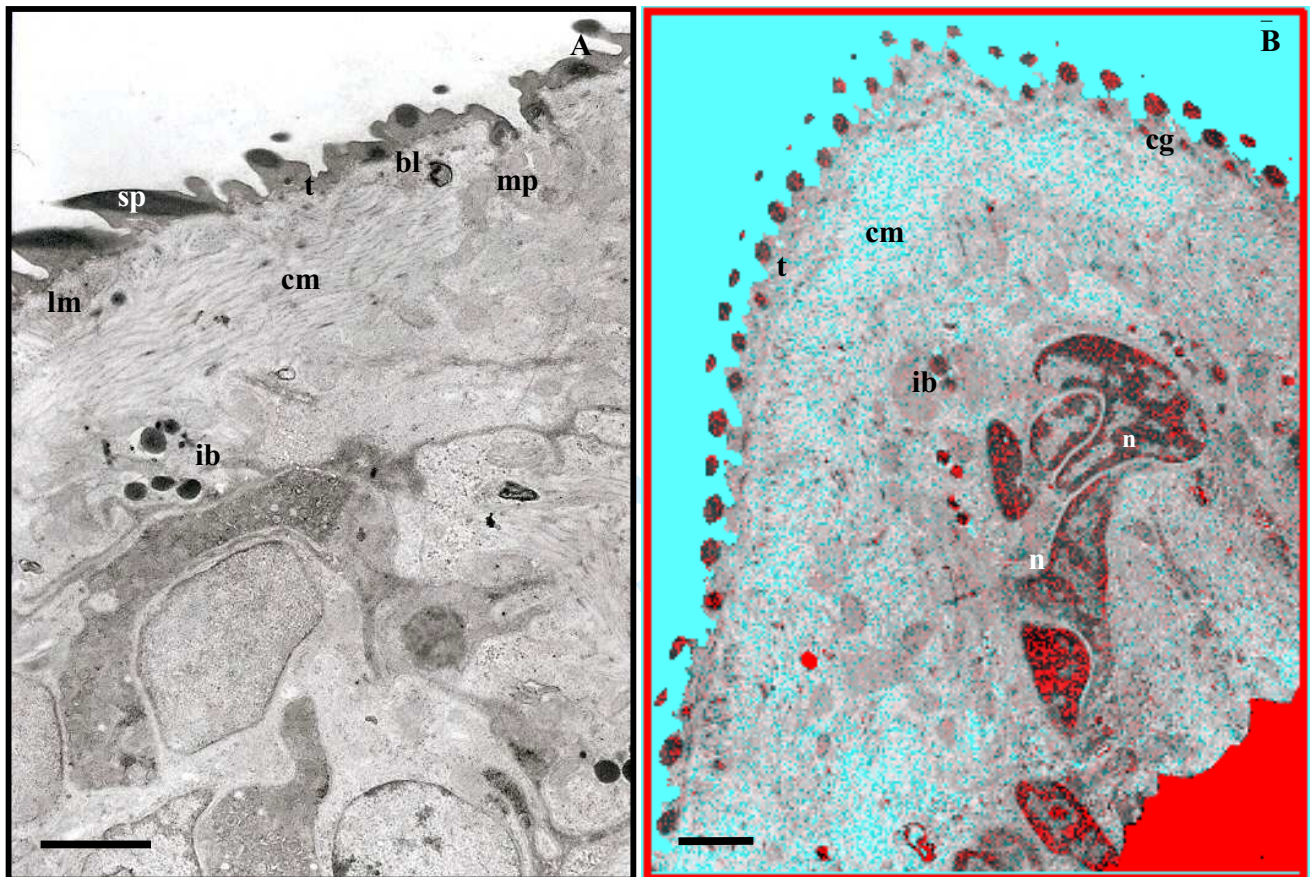


Figure 1 (A-B) - Transmission electron micrograph of infective larvae of *S. mansoni*. The following structures are indicated: tegument (t), spines (sp), granule cercarial (cg), circular muscle (cm), longitudinal muscle (lm), basal lamina (bl) nucleus of muscle cell (n), inclusion bodies (ib), multiciliated pit (mp) in the anterior organ. Bar = 1 μ m, TEM.

Figure 2

Cercaria of *S. mansoni*
Cholesterol localization
Filipin technique

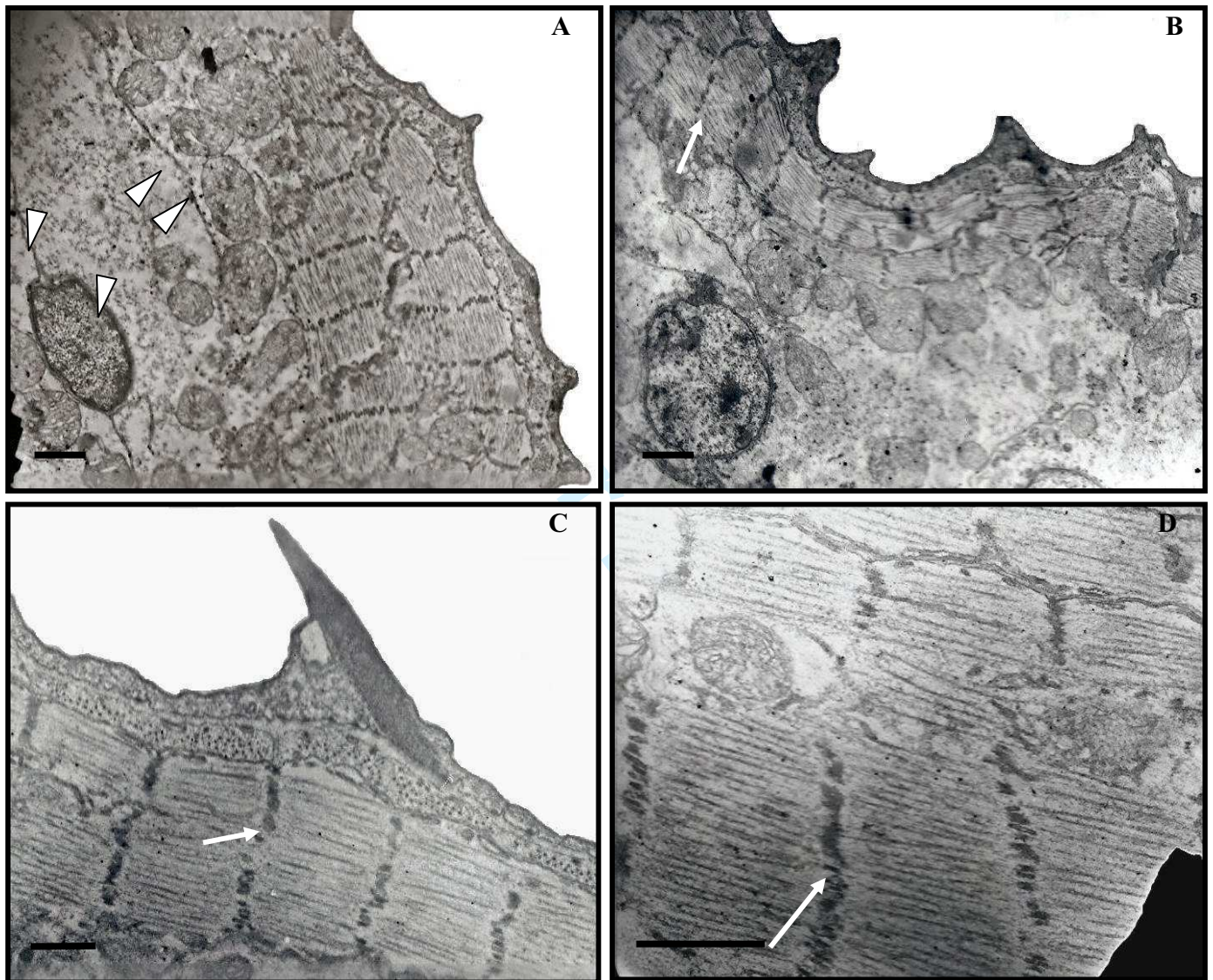


Figure 2 (A-D) - Ultrathin sections of cercaria of *S. mansoni* processed for the identification of saturated lipids. Transversal section showing reaction product, distributed in the circular muscles (arrows) besides of reaction product in the internal compartments of the infective larva (arrowheads). Bar A e B = 1 μ m, C e D = 2 μ m, TEM.

Figure 3

Cercaria of *S. mansoni*
 Localization of insaturated lipid (MET)
 Techniques of imidazole buffer

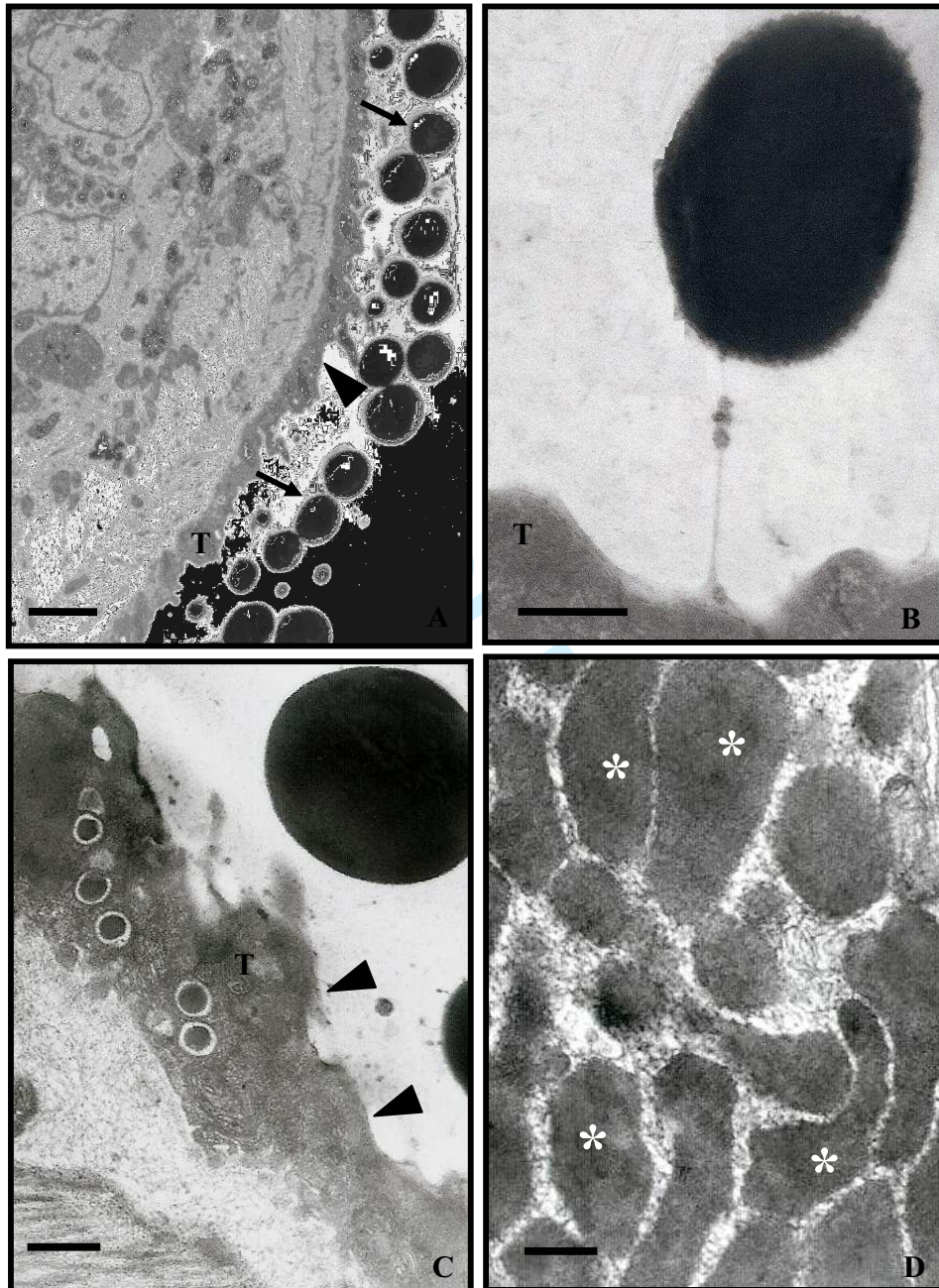


Figure 3 (A-D) - Ultrathin sections of cercaria of *S. mansoni* postfixed in imidazole osmium tetroxide solution. Fig A. Transversal section showing reaction product, globular shape, uniformly distributed on the helminth surface (arrows). Observe the reaction on the tegument (arrowhead). Fig B. The unsaturated fatty acids are bond in the cercaria surface. Fig C. Observe the reaction in the tegument (arrowheads). Fig D. Reaction product int the inclusion bodies (asterisks). T= tegument, Bar= 4 μ m, TEM.

Figure 4

Cercaria of *S. mansoni*
Localization of insaturated lipid (VEM)
Techniques of imidazole buffer

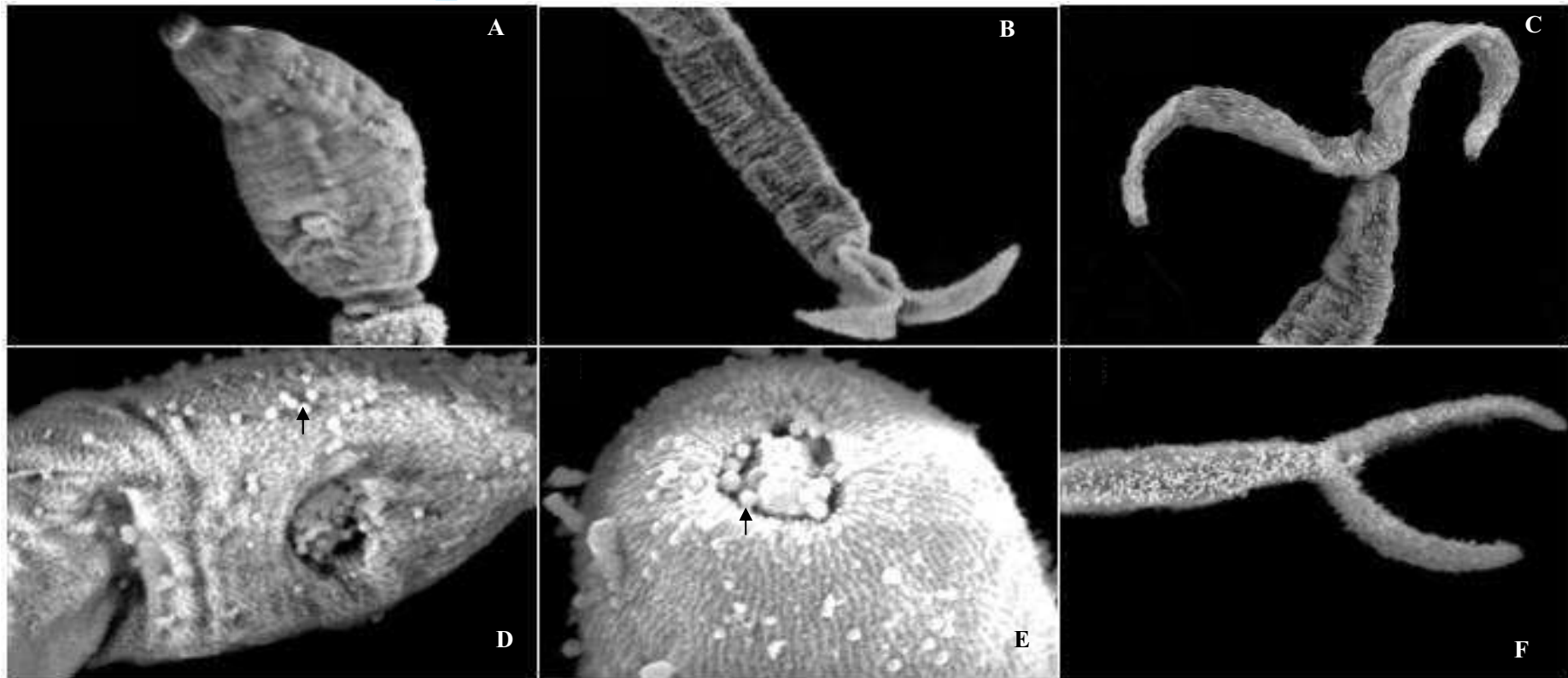


Figure 4 (A-F) – Cercaria of *S. mansoni* observed by MEV. Fig **A**, **B** and **C**: cercaria control. Fig **D**, **E** and **F**, cercaria processed for location of unsaturated lipids (Technique of imidazole buffer), observe the presence of reaction product of globular shape in the body and tail. Fig. **A** = 1.300x, Fig. **B** = 800x, Fig. **C** = 950x, Fig. **D**= 2.000x, Fig. **E** = 4.000x, and Fig. **F** = 800x.

ARTIGO 2

Ultrastructural and Cytochemical Aspects of the cercaria of *Schistosoma mansoni*

^{a, b} Cavalcanti, M. G. S.; ^a Araújo, H. C. R.; ^a Pimentel, R.N.C.; ^a Barbosa, C. C. G. S.; ^a Nascimento, R.C.; ^b Lima-Filho, J. L.; ^{a, b, c} Brayner, F. A.; ^{a, b, c, d} Alves, L. C.

^a Departamento de Parasitologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (FIOCRUZ), Recife - PE, Brazil.

^b Laboratório de Imunopatologia Prof.º Keizo Asami (L IKA) da Universidade Federal de Pernambuco, Recife - PE, Brazil.

^c Faculdade São Miguel, Recife - PE, Brazil.

^d Universidade de Pernambuco (UPE), Recife - PE, Brazil.

Corresponding author:

Marília Gabriela dos Santos Cavalcanti

Department of Parasitology

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ FIOCRUZ

Av. Moraes Rego s/n, Campus da UFPE

CEP 50670-420, Recife, Pernambuco - Brazil.

E-mail address: marilia@cpqam.fiocruz.br

Phone: +55 81 2101-2643

Fax: +55 81 2101-2516

Resumo

Uma alternativa para identificar a base de processos críticos necessários ao estabelecimento do parasito no hospedeiro é focar o estágio responsável pela invasão primária, ou seja, a estrutura infectante. O enfoque deste trabalho foi realizar uma caracterização ultra-estrutural da cercária de *Schistosoma mansoni*, através de técnicas citoquímicas. Para a identificação de proteínas básicas foram empregadas as técnicas do ácido fosfotungstico (PTA) e da Prata Amoniacal. Para localizar sítios de cálcio utilizamos a técnica descrita por Hepler (1980) e para evidenciar grupamentos aniônicos empregamos ferritina cationizada além do tratamento enzimático com tripsina, condroitinase e neuraminidase de *Vibrio cholerae*. Através da PTA foi identificada a presença de proteínas básicas no tegumento, núcleo e nucléolo de células subtegumentares, corpos de inclusão e glândulas pré-acetabulares. Com a prata amoniacal, identificamos forte marcação em toda larva infectante principalmente no núcleo das células musculares, tecido muscular circular e glândulas pré-acetabulares. A localização de sítios de cálcio mostrou-se bastante uniforme, demarcando os espaços internos da larva, principalmente as células musculares. As amostras tratadas com ferritina cationizada apresentaram uma forte marcação em nível cuticular. O tratamento das amostras com a neuraminidase não alterou o padrão de marcação dessas partículas na superfície do trematóide. Porém, o tratamento com tripsina ou condroitinase resultou numa ausência de marcação na superfície da larva. O esclarecimento da composição bioquímica da larva infectante de *S. mansoni* fornece dados para um melhor entendimento a respeito da biologia do parasito bem como fornecer subsídios para esclarecer a intrigante relação parasito-hospedeiro.

Palavras-chave: cercária de *Schistosoma mansoni*, citoquímica ultra-estrutural

Introdução

A esquistossomose constitui um dos mais graves e complexos problemas de saúde pública em nosso território devido à falta de uma vacina, às falhas na tentativa de erradicar o molusco vetor e ao desenvolvimento de resistência do parasita às drogas anti-esquistossomóticas (KALIFE et al., 2000).

Apesar de um século da sua descoberta e do grande número de pesquisas desenvolvidas, a esquistossomose atinge 74 países, envolvendo milhões de pessoas em países latino-americanos e africanos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1998).

O controle desta helmintíase deve ser considerado sob dois aspectos, ou seja: o da morbidade e o da transmissão. Para o controle da morbidade, que visa diminuir o aparecimento de casos da forma grave, o diagnóstico e o tratamento são suficientes, apesar de que o sucesso da quimioterapia no tratamento da esquistossomose em áreas de alta prevalência não tem sido duradouro, havendo a rápida re-infecção. Em relação à transmissão, apenas o tratamento das populações infectadas não é suficiente sendo necessário também interromper o ciclo evolutivo do parasito no hospedeiro intermediário (KATZ, 1980).

Mesmo com empenho de muitos pesquisadores e instituições de pesquisa de várias partes do mundo, na busca de um possível controle, esta parasitose continua em franca expansão. Apesar de vários trabalhos relacionados ao estudo da fase parasitária responsável pela infecção, a cercária, nenhum deles enfocou a caracterização citoquímica em nível ultra-estrutural.

Existem, na literatura, alguns trabalhos caracterizando morfologicamente a cercária de *S. mansoni*, porém poucos correlacionam a morfologia com a composição química da mesma.

Através de uma caracterização citoquímica é possível identificar a composição bioquímica de um determinado sistema biológico e através da associação dessa técnica à ultra-estrutura possibilita a identificação "in loco" de proteínas, carboidratos, lipídios entre outros, permitido não só a identificação como também a localização e quantificação desses compostos (SOUZA, 1998).

O presente artigo tem como objetivo localizar proteínas básicas, cálcio e sítios aniônicos na cercária de *S. mansoni* utilizando técnicas citoquímicas aplicadas à ultra-estrutura. A relação desses componentes bioquímicos e sua localização podem facilitar na identificação de prováveis funções para estes constituintes.

Materiais e Métodos

Parasitas: As cercárias de *S. mansoni* foram obtidas de caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata*. Estes moluscos eram infectados com miracídios de *S. mansoni*, cepa Belo Horizonte, e mantidos no Laboratório de Esquistossomose, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Recife, Brasil.

Ultra-estrutura: As amostras foram fixadas em glutaraldeído a 2,5%, paraformaldeído a 4%, CaCl_2 a 5mM em tampão cacodilato de sódio a 0,1M, pH 7,2, por 2 horas em temperatura ambiente, lavadas no mesmo tampão e pós-fixadas em OsO_4 a 1% em tampão cacodilato de sódio a 0,1M, pH 7,2, por 1 hora. Após a pós-fixação foram lavadas no mesmo tampão, contrastadas em bloco com acetato de uranila a 2%, lavadas novamente e desidratadas em séries crescentes de acetona. A infiltração e o emblocamento foram realizados com a resina Epon.

Marcação Citoquímica

PTA: As cercárias foram fixadas (GA 2,5% em T. caco a 0,1M) overnight e lavadas em T. Caco a 0,1M, após a lavagem, o material foi desidratado em concentrações crescentes de etanol, em seguida, o material foi incubado em PTA a 2% em etanol durante 24 a 72h, após a incubação, foi realizado a lavagem em etanol puro (2X, 10 min) e posteriormente, em etanol e acetona (1:1) por 10 min e acetona absoluta 2X por 10 min. Após a desidratação o material foi embebido e emblocado em Epon.

Prata Amoniacal: Após a obtenção das cercárias, as mesmas foram fixadas utilizando o GA a 2.5% em tampão Caco a 0.1M. Após a fixação, o material foi lavado exaustivamente em água destilada e posteriormente incubado por 5 min em uma solução de prata amoniacal. Após a incubação foi realizada uma lavagem em água e posteriormente o material foi incubado em formaldeído 3% durante 5 min, lavado em água destilada e pós fixado em ósmio a 1%. Depois, as amostras foram processadas para a rotina e observados no MET.

Cálcio: As cercárias obtidas foram lavadas e fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,2 com CaCl₂ 5mM overnight a temperatura ambiente. Após a fixação, o material foi lavado em T. Caco 0,1M, pH 7,2 contendo 10mM de cloreto de cálcio durante 10 min (duas vezes). A pós-fixação foi realizada utilizando-se ósmio a 1% em T. caco a 0,1M, pH 7,2 contendo 10mM de cloreto de cálcio e 0,8% de ferricianeto de potássio durante 2h no escuro. Duas lavagens foram realizadas com T. Caco 0,1M contendo 10mM de cloreto de cálcio durante 10 min. Em seguida, foi realizada a contrastação em bloco, com acetato de uranila aquoso a 2% durante 2h. A desidratação e a inclusão foram feitas como rotina.

Ferritina Cationizada: para localização de sítios aniônicos, os parasitas foram fixados e depois incubados por 60 min em temperatura ambiente em uma solução contendo 1 mg/ml de partículas de ferritina cationizada, pH 7.2 (DANON et al. 1972). Após a incubação, as amostras foram lavadas 03 vezes no mesmo tampão, desidratadas e infiltradas com resina Epon.

Tratamento enzimático: as cercárias foram incubadas por 5 min em uma solução contendo 500 µg/ml de tripsina (Sigma tipo III, pH7,2) ou por 60 min na presença de 0.03 U/ml de neuraminidase de *Vibrio cholerae* (Sigma) em pH 6.0 ou por 18 h na presença de 0.1 U/ml de condroitinase AB (Sigma) pH 8.0. Todos esses tratamentos foram conduzidos em 37°C sob agitação (SOUZA et al. 1989).

Resultados

Morfologia Geral

Utilizando procedimento de rotina, as cercárias de *S. mansoni* foram analisadas através do Microscópio Eletrônico de Transmissão (Fig. 1A). Foi evidenciado que a mesma apresenta espinhos que são facilmente visíveis estando presentes tanto no corpo como na cauda.

Sob o tegumento da cercária encontram-se, consecutivamente, a lâmina basal (lb) e arranjo de músculos fibrosos circulares (mc) e longitudinais (ml). Ainda no tegumento é possível evidenciar estruturas eletrondensas denominadas de corpos cercarianos (Fig. 1A).

Corpos de inclusão (ib) podem apresentar formato esférico, alongado ou discóide e apresentam, em geral, uma região central eletrondensa e região periférica translúcida (Fig. 1A).

Localização de Proteínas Básicas (PTA e Prata Amoniacal)

Para a detecção de proteínas básicas, foram utilizadas as técnicas de PTA e Prata Amoniacal. O material processado de acordo com PTA foi incubado no período de 24 a 72 horas em (PTA a 2% em etanol puro). Através da técnica do ácido fosfotúngstico foi identificado a presença de proteínas básicas no tegumento (Fig. 2A),

núcleo e nucléolo de células subtegumentares (Fig. 2B e C), corpos de inclusão (não mostrado) e glândulas pré-acetabulares (Fig. 2D).

Utilizando a técnica de prata amoniacal, identificamos uma forte marcação sobre toda a larva infectante (Fig. 3 A e B). Evidenciamos também, marcações no núcleo de células musculares (não mostrado), tecido muscular circular (Fig. 3C) e nas glândulas pré-acetabulares (Fig. 3D).

Localização de Cálcio

Através da técnica de Hepler (1980) que utiliza o CaCl_2 no glutaraldeído e a pós-fixação com tetróxido de ósmio com ferricianeto de potássio, identificamos a presença de sítios celulares que contém cálcio. A marcação ficou evidente em todo interior da cercária. A distribuição mostra a presença de cálcio entre os compartimentos da larva, indicando que há uma distribuição uniforme nos espaços internos da larva infectante (Fig. 4A-B).

Tratamento Enzimático:

As amostras tratadas com ferritina cationizada apresentaram uma boa preservação das estruturas internas e forte marcação em nível cuticular, mostrando uma marcação uniforme em toda superfície (Fig. 5A). O tratamento das amostras com a neuraminidase seguido de incubação com ferritina cationizada não alterou o padrão de marcação dessas partículas na superfície do trematóide (Fig. 5A). Porém, o tratamento

com condroitinase (Fig. 5C) ou tripsina (Fig. 5D) resultou numa ausência de marcação na superfície da larva infectante.

Discussão

No presente estudo, utilizamos duas técnicas citoquímicas (PTA e a prata amoniacal) para detecção de proteínas básicas a nível ultra-estrutural. Apesar de ambas as técnicas detectam proteínas básicas, as mesmas possuem diferentes especificidades, o PTA revela proteínas ricas em histidinas e a prata amoniacal, arginina e lisina (SOUZA, 1998).

De acordo com a técnica de PTA identificamos a presença de proteínas básicas no tegumento, núcleo e nucléolo de células subtegumentares, corpos de inclusão e glândulas pré-acetabulares.

Como a técnica de PTA detecta proteínas ricas em histidina e estas estão comprometidas numa série de funções celulares tais como a diferenciação celular e a regulação da função gênica de células eucarióticas, a localização delas no núcleo e nucléolo de células subtegumentares só confirmam a especificidade da reação.

De acordo com Dorsey et al. (2002) os corpos de inclusão originam-se do complexo de golgi e apresentam como função a formação da membrana heptalaminar externa. Como esta membrana apresenta em sua constituição proteínas, é possível que muitas delas sejam básicas por se originarem dos corpos de inclusão.

Segundo o estudo realizado por Stirewalt (1959) as glândulas pré-acetabulares apresentam secreções importantes na penetração da cercária no hospedeiro, tais secreções possuem ação proteolítica. De acordo com nossos resultados, a marcação de PTA nessas glândulas indicam a presença de proteínas básicas ricas em histidina que podem estar relacionadas no processo de penetração do hospedeiro.

Utilizando a técnica de prata amoniacal, identificamos uma forte marcação sobre toda a larva infectante. Evidenciamos também, marcações no núcleo de células musculares, tecido muscular circular e assim como a PTA, as glândulas pré-acetabulares também foram marcadas.

Os íons de cálcio desempenham papel de muita relevância em uma série de atividades celulares e estão envolvidos com a contração muscular, o movimento de cílios e flagelos, despolarização, secreção, ativação de microtúbulos e microfilamentos, endocitose e exocitose (SOUZA, 1998).

Apesar de haver alguns trabalhos sobre a presença do cálcio na cercária, nenhum fez esta abordagem ultra-estruturalmente. A elucidação da localização de depósitos de cálcio na larva infectante em nível ultra-estrutural seria de extrema importância, pois evidenciaria com detalhe a distribuição do íon e dessa forma torna-se possível correlacionar a localização "*in loco*" com a função.

Em nosso trabalho ficou evidente a presença de cálcio em toda a região interna da cercária. De acordo com a marcação, o íon está distribuído de forma regular, e parece demarcar os espaços internos da larva infectante.

O cálcio foi evidenciado também nas glândulas pré-acetabulares (dados não mostrados). Utilizando técnicas histoquímicas vários trabalhos identificaram a presença

de cálcio nas glândulas pré-acetabulares (GORDON; GRIFFITH, 1951; STIREWALT, 1959). De acordo com Dresden e Asch (1977) o cálcio encontrado na glândula está combinado formando o carbonato de cálcio. Este achado está embasado na análise da secreção da glândula e na análise físico-química da cercária.

Vários estudos indicaram que o complexo enzima-secreção da cercária de *S. mansoni* são responsáveis pelas alterações histológicas e histoquímicas do extrato córneo e conexões acelulares das barreiras teciduais do hospedeiro durante a passagem tecidual pela pele (LEWERT, 1958; STIREWALT, 1963). Existem várias evidências de que algumas dessas enzimas estão presentes nas glândulas pré-acetabulares e possuam ação proteolítica (STIREWALT, 1959). Alguns trabalhos têm levantado a possibilidade dos íons de cálcio atuarem como ativadores enzimáticos nesse processo.

A coloração seletiva de Alizarin Red S (ARS) pela glândula pré-acetabular sugere que os íons de cálcio estão presentes na glândula. Utilizando Schiff Base, glyoxal-bis (2 hydroxyanil), ou GBHA para a detecção citoquímica de íons de cálcio foi evidenciado a presença do íon nas glândulas pré-acetabulares e ductos de *S. mansoni*, tal método é até mais específico para a detecção de íons de cálcio do que o ARS (Lewert et al., 1966).

A observação do material liberado da cercária de *S. mansoni* após o estímulo confirma as diferenças físicas e histoquímicas da composição das glândulas pré e pós-acetabular. Essas diferenças no conteúdo das duas glândulas refletem as diferenças na função, pois a secreção da glândula pós-acetabular tem função adesiva, de proteção e ação enzimática, em contraste com a função lítica do conteúdo liberado pela glândula pré-acetabular (LEWERT et al., 1966).

Utilizando técnicas físico-químicas Dresden e Edlin (1975) encontraram que cada cercária apresenta em média cerca de 10 a 15ng de cálcio.

De acordo com Lewert e Lee (1954) o cálcio e/ou magnésio apresentam funções similares. De acordo com os autores eles podem desempenhar funções semelhantes à de uma co-enzima ou serem ativadores de enzimas líticas localizadas na secreção da glândula. Além disso, existe uma correlação *in vitro* do efeito do cálcio, magnésio e íons de zinco na atividade enzimática da cercária de *S. mansoni*, e o efeito *in vivo* na atuação desses íons durante a penetração. Nesse estudo foi constatado que o sucesso na penetração da cercária depende da concentração de íons na água. Isso pode explicar, em parte, as diferentes taxas de infecção encontradas em vários laboratórios.

Murrel et al (1983) relacionaram a presença de grupamentos carregados negativamente na superfície de nematódeos com a proteção contra a dessecação. Por outro lado, é possível que tais grupamentos ativem o sistema complemento via fator de Hageman ou fator VII da coagulação, e conseqüentemente, desencadeando reações inflamatórias.

Utilizando ferritina cationizada, pH 7,2 observamos a presença de sítios aniônicos associados com a camada externa da larva. Esses resultados são similares aos observados em outros helmintos: L3 de *Wuchereria bancrofti* (SILVA et al 2006), *Strongyloides ratti* e *Trichinella spirallis* (MURREL et al. 1983).

O tratamento das amostras com a neuraminidase seguido de incubação com ferritina cationizada não alterou o padrão de marcação dessas partículas na superfície do trematóide. Nossos resultados utilizando a neuraminidase de elevada especificidade indicam que o grupamento carboxílico não está envolvido na carga de superfície da

cercária de *S. mansoni*. Estes resultados estão de acordo com o que foi observado por Himmelhoch e Zucherman (1978) trabalhando com *C. briggsae*.

O tratamento com tripsina resultou numa ausência de marcação, esta observação indica que ao contrário do que é encontrado em outros sistemas biológicos, as glicoproteínas sensíveis a tripsina devem estar contribuindo de forma significativa na superfície negativa da cercária (SOUZA, 1989).

Os resultados também evidenciam que o tratamento nas cercárias *in vivo* com condroitinase AB, que possui especificidade para os glicosaminoglicanos condroitina-4-sulfato (A) e dermatan sulfato (B) inibe a ligação com partículas cationizadas de ferritina. Esta observação sugere que a presença de glicosaminoglicanas no tegumento da cercária de *S. mansoni*. Porém, mais estudos bioquímicos são necessários para confirmar esta observação citoquímica.

Através da análise de proteínas básicas, cálcio e grupamentos aniônicos na cercária de *S. mansoni* pudemos concluir que a localização desses compostos está fortemente relacionados às diversas funções da larva que vão desde a locomoção para encontro do hospedeiro até mesmo a sobrevivência dessas cercárias no ambiente.

Referências

DANON, D. et al. Use of cationized ferritin as a label of negative charges on cell surfaces. **J Ultrastruct Res.** Mar, v. 38, n. 5, p.500-10, 1972.

SOUZA et al. Fine structure and localizations of anionic sites on the surface of microfilaria of *Wuchereria bancrofti*. **J Submicrosc Cytol Pathol.**, v. 21, n. 1, p. 121-129, 1989.

SOUZA, **Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicada às ciências biológicas**, Sociedade Brasileira de Microscopia, 179f, 1998.

DORSEY, C.H. et al. Ultrastructure of the *Schistosoma mansoni* cercaria; **Micron**, v. 33, n. 3, p.279-323,2002.

DRESDEN M. H.; ASCH HL. Calcium carbonate content of the preacetabular glands of *Schistosoma mansoni* cercariae. **J Parasitol.** v.63, n. 1, p.163-5, 1977.

DRESDEN, M. H.; EDLIN, E. M. *Schistosoma mansoni*: Calcium Content of Cercariae and Its Effects on Protease Activity In vitro . **J Parasitol.**, v. 61, n.. 3, p. 398-402, 1975.

GORDON, R. M.; GRIFFITH, R.B. Observations on the means by which the cercariae of *Schistosoma mansoni* penetrate mammalian skin, together with an account of certain morphological changes observed in newly penetrated larvae. **Ann. Trop. Med.**, v.45, p. 227-243, 1951.

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

HIMMELHOCH, S.; ZUCKERMAN, B. M. *Caenorhabditis briggsae*: aging and the structural turnover of the outer cuticle surface and the intestine. **Exp Parasitol.** Aug, v. 45, n. 2, p. 208-14, 1978.

KALIFE, J. et al. Mechanisms of resistance to *S. mansoni* infection: the rat model. **Parasitol Int**; v. 49, p.339-345, 2000.

KATZ, N. Experiências com quimioterapia em grande escala no controle da esquistossomose no Brasil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo.**, v. 22, p. 40-51, 1980.

LEWERT, R. M. ; LEE, C. L. Studies on the passage of helminth larvae through host tissues. I. Histochemical studies on the extracellular changes caused by penetrating larvae. II. Enzymatic activity of larvae in vitro and in vivo. **J Infect Dis.** Jul-Aug, v. 95, n. 1, p.13-51, 1954.

LEWERT R. M.; HOPKINS D. R. MANDLOWITZ S. The role of calcium and magnesium ions in invasiveness of schistosome cercariae. **Am J Trop Med Hyg.** May, v. 15, n. 3, p.314-23, 1966.

LEWERT, R. M. Invasiveness of Helminth Larvae. The Rice Institute Pamphlet. V.XLV, n.1, p. 97-113, 1958.

MURRELL, K.D.; GRAHAM, C.E.; MCGREEVY, M. *Strongyloides ratti* and *Trichinella spiralis*: net charge of epicuticle. **Exp Parasitol.**, v.55, n. 3, p. 331-9, 1983.

SILVA, L. F. et al. Cytochemical characterization of the third-stage larva of *Wuchereria bancrofti* (Nematoda: Filarioidea). **Parasitol Res.** Jun; v. 99, n. 1, p. 14-20. Epub Feb 1, 2006.

STIREWALT, M. A. Cercaria vs. schistosomule (*Schistosoma mansoni*): absence of the pericercarial envelope in vivo and the early physiological and histological metamorphosis of the parasite. **Exp Parasitol.** Jun; v.13, p.395-406, 1963.

STIREWALT, M.A. Isolation and characterization of deposits of secretion from the acetabular gland complex of cercariae of *Schistosoma mansoni*. **Exper. Parasitol.**, v. 8, p. 199-214, 1959.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) – Report of the WHO informal consultation on schistosomiasis control. Geneva, Switzerland. Document WHO/CDS/CPC/SIP/99.2, 1998.

Figura 1

Cercária de *S. mansoni*
Processamento de Rotina
Controle

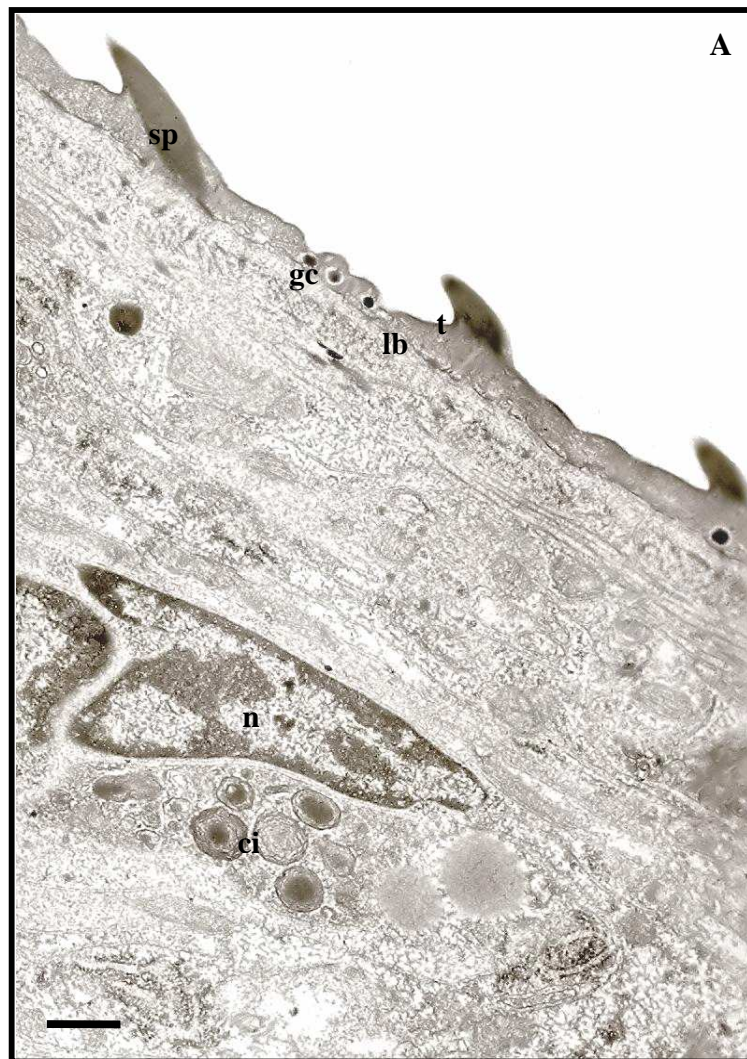


Fig. 1 A: Cercária de *S. mansoni* processada para rotina. Observar, no tegumento (t), a presença de espinhos (sp) e grânulos cercarianos (gc). Abaixo do tegumento, a lâmina basal (lb), presença de corpos de inclusão (ci) e núcleo de células subtegumentares (n), Barras= 1 μ m.

Figura 2

Cercária de *S. mansoni*
Localização de Proteínas Básicas
PTA

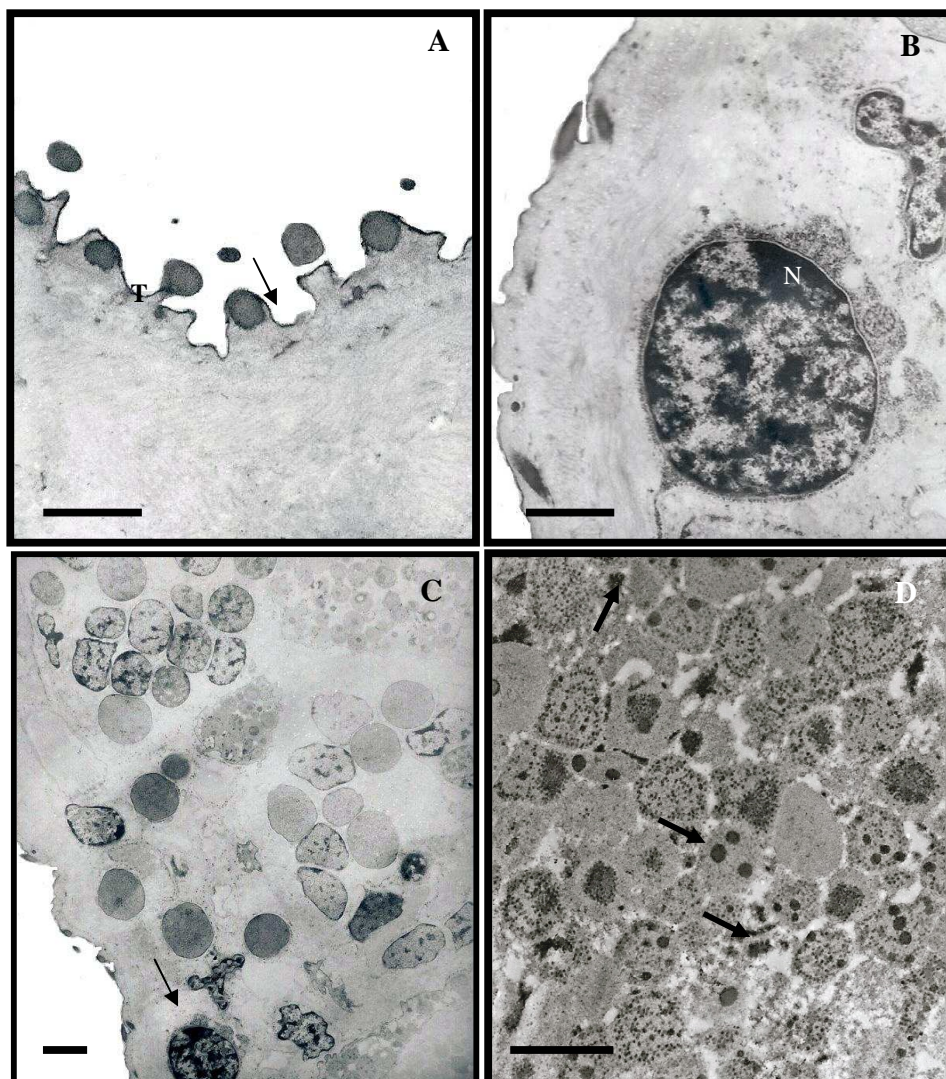


Fig.2 A-D, Cortes transversais da cercária de *S. mansoni* submetidas à PTA para a detecção de proteínas básicas. Na fig. **A**, marcação de PTA sobre todo o tegumento, Fig. **B-C**, marcação no núcleo (N) de células subtegumentares. Na Fig. **D**, marcação (setas) de proteína básica na glândula pré-acetabular. Barras A e C = 0,5 μ m, Barras B e D = 1 μ m

Figura 3

Cercária de *S. mansoni*
Localização de Proteínas Básicas
Técnica da Prata Amoniacal

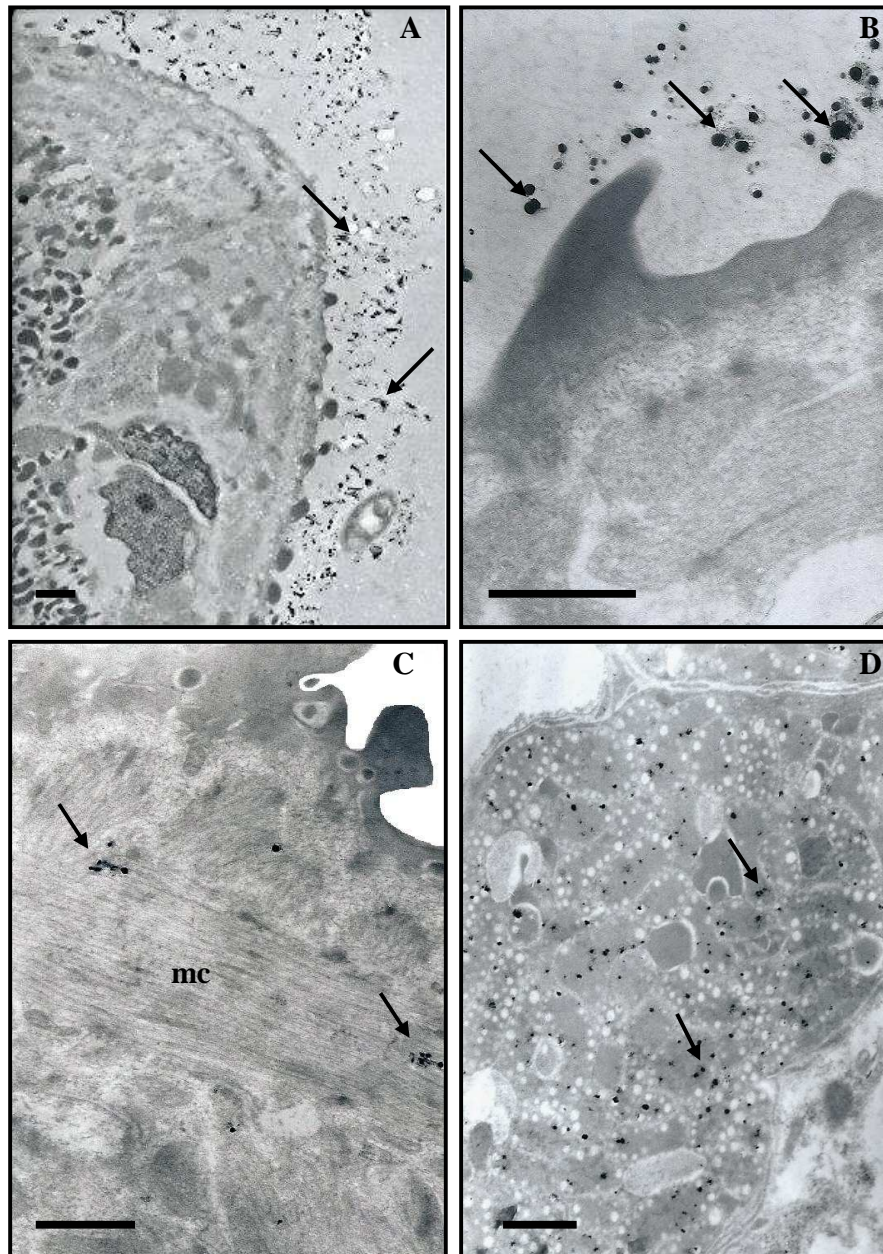


Fig 3 A-D. Cortes transversais da cercarias de *S. mansoni* processadas segundo a técnica da Prata Amoniacal. Marcação (setas) sobre toda a larva infectante (Fig. **A e B**), presença de proteínas básicas (setas) no tecido muscular circular (mc) (Fig. **C**) e nas glândulas pré-acetabulares (setas), Fig. **D**. Barra A= 0,5 μ m e Barras B-D = 2 μ m

Figura 4

Cercária de *S. mansoni*
Localização de Cálcio
Técnica de Hepler

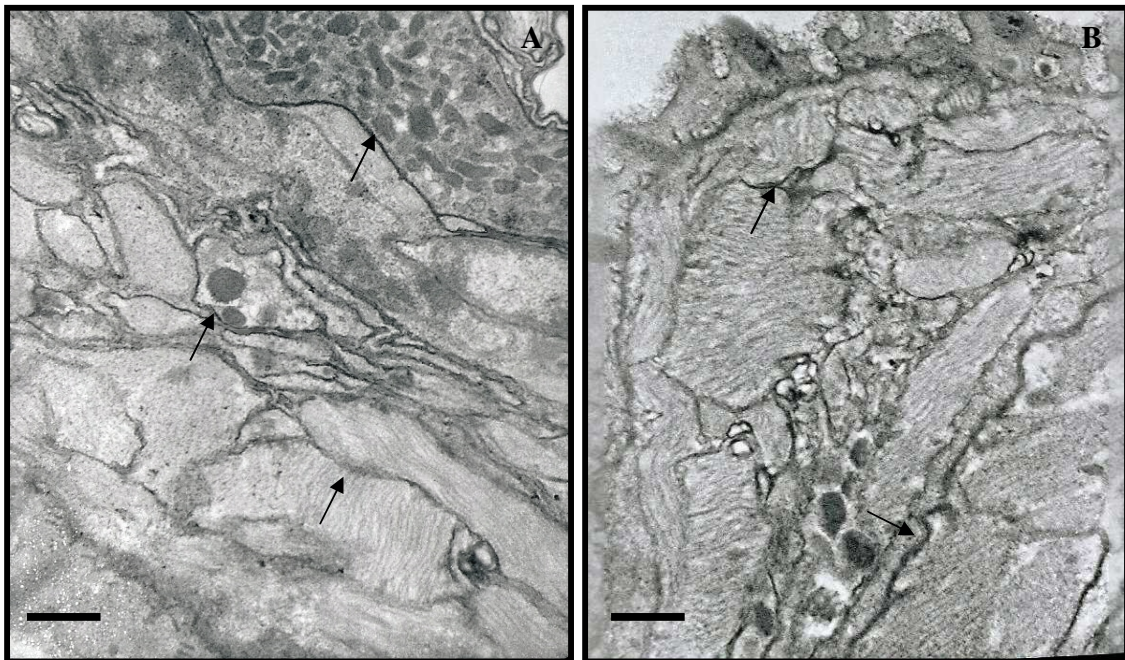


Fig. 4 A-B: Cortes transversais da cercária de *S. mansoni* processadas segundo a técnica de Hepler. A marcação (setas) ficou evidente em todo interior da cercária. A distribuição mostra a presença de cálcio entre os compartimentos da larva infectante. Barras= 2 μ m, MET.

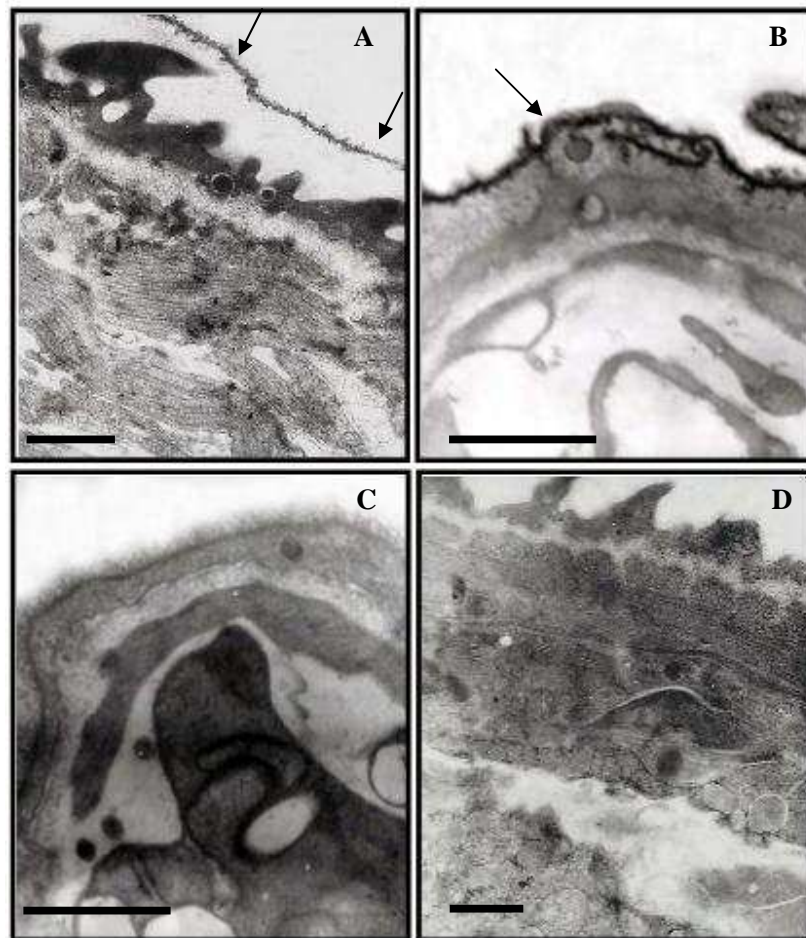
Figura 5**Cercária de *S. mansoni*
Localização de Cargas Aniônicas**

Fig. A – Cercária de *S. mansoni* processadas para detecção de sítios aniônicos, observa-se uma marcação uniforme na superfície (setas). **Fig. B** – Tratamento com neuraminidase permitiu uma ligação com partículas catiônicas (seta). **Fig. C** – Tratamento com condroitinase AB, aboliu completamente a ligação com partículas catiônicas. **Fig. D** – Tratamento com tripsina inibiu totalmente a ligação com partículas de ferritina. Barras = 1 μ m.

DISCUSSÃO

A presença de lipídios nos nematóides tem atraído muita atenção devido às inúmeras funções que este componente pode desempenhar.

Apesar da linha Z ser uma entidade proeminente do músculo estriado, sua composição e função durante a contração permanece incerta. A marcação da linha Z após o processamento pela técnica de filipina indica a presença de lipídios como colesterol e seus ésteres nessa estrutura. Tais resultados estão de acordo com as observações de Garamvolgyi (1965, 1968) e Harsanyi e Garamvolgyi (1969) que após a remoção da linha Z com lipase pancreática de músculos de insetos e músculos esqueléticos de coelhos sugeriram que esta linha possa ter além de proteínas, componentes lipídicos.

Takahashi et al., (2001) identificaram que os principais lipídios encontrados na linha Z foram: fosfolipídios, triacilgliceróis, colesterol e ácidos graxos livres. Foi descrito também que tais lipídios provavelmente estejam servindo como agentes auxiliares na estruturação eletrostática de filamentos Z vizinhos, além disso, esses lipídios reforçariam a estrutura da linha Z e desempenhariam um papel importante na transmissão da força muscular.

Como identificamos também a presença de lipídios saturados na cercária de *S. mansoni* esse material lipídico certamente estará contribuindo estruturalmente na especialidade da larva infectante que é o processo de locomoção.

A técnica utilizada para a detecção de lipídios insaturados foi a do tampão imidazol que emprega o complexo ósmio-imidazol. Através da utilização desta técnica foi possível evidenciar que as cercárias de *S. mansoni* tratadas com tampão imidazol apresentaram uma forte marcação em toda a superfície do parasito. Utilizando um maior aumento ficou claro que o material lipídico de superfície está conectado a larva através de um material que possui na sua composição lipídios insaturados, porém, com eletrondensidade diferente.

Shiff et al. (1972) identificaram que lipídios presentes na pele do hospedeiro humano influenciam a cercária de *S. mansoni* e *S. haematobium* durante a penetração. De acordo com seus estudos, a larva infectante é estimulada pela presença de ácidos graxos na superfície do hospedeiro. Da mesma forma, Stirewalt (1966) evidenciou a importância de lipídios do hospedeiro como estímulo para as cercárias na penetração.

Como há lipídios insaturados na superfície da cercária é possível que este material lipídico esteja servindo como um agente facilitador na aproximação com o hospedeiro já que o mesmo também apresenta lipídio na superfície da pele.

Apesar da localização ultra-estrutural de lipídios insaturados, o nosso trabalho não deixou claro de onde surgiu este componente. Porém, como as cercárias foram obtidas poucas horas após a liberação do caramujo, é possível que os lipídios insaturados evidenciados pela técnica do tampão imidazol sejam adquiridos do hospedeiro invertebrado. Dessa forma, nossos resultados estão de acordo com Ivanov (1950) que indicou que os lipídios presentes no corpo da cercária são sintetizados a partir da gordura absorvida do hospedeiro intermediário. Faust (1917) através de experimentos elucidou a presença de lipídios no citoplasma das células do hepatopâncreas de caramujos infectados. Os resultados obtidos por Faust foram confirmados por Hurst (1927) que também demonstrou um discreto aumento do material lipídico em *Physa occidentalis* infectado com *Echinostoma revolutum*.

Outra possível função da presença de gotículas lipídicas na superfície cercariana é que estas podem estar relacionadas com a proteção da larva às adversidades do meio externo.

Como a cercária precisa nadar até chegar o hospedeiro a presença de lipídios insaturados na superfície poderia facilitar durante a locomoção da larva infectante na água já que a interação polar da água com apolar (lipídio) permite um melhor deslizamento da cercária na solução aquosa. Isso seria energeticamente mais favorável já que o atrito com a água seria menor.

De acordo com Ginecinskij (1961) o lipídio presente em nematóides pode desempenhar também um papel hidrostático, pois diminui o peso do corpo. Ele mostrou que em espécies não-nadadoras não foi encontrado lipídio, porém o mesmo pôde ser encontrado em pequenas quantidades em espécies que deslizam e uma quantidade relativamente grande naquelas que apresentam uma ativa função nadadora.

Como as cercárias não se alimentam no meio aquático é possível que o estoque de energia possa estar associado aos lipídios. Em nossos estudos como os lipídios também foram encontrados no interior da larva infectante, estes componentes podem estar envolvidos com a reserva energética da mesma após sua saída do caramujo.

Ginecinskij (1961) ao estudar outras espécies como: *Opisthioglyphae ranae*, *Cotylurus brevis* e *Cercaria spinulosa* observou que os lipídios são completamente consumidos durante a locomoção da cercária e apenas a espécie *Cercaari helvetica* apresentou uma diminuição dos lipídios. Nesse estudo o autor observou também que não há nenhum lipídio estocado em cercárias que não nadam e há uma quantidade relativamente maior em cercárias ativas, sugerindo, dessa forma, uma relação entre o grau de atividade e lipídios estocados.

Os lipídios insaturados foram evidenciados no tegumento, glândula da cabeça, glândula pré-acetabular e corpos de inclusão. Uma das possíveis funções da glândula da cabeça é prover material para reparar e reorganizar o tegumento da ventosa oral após a penetração no hospedeiro (HOCKLEY; MCLAREN, 1973). Como observamos a presença de material lipídico na glândula da cabeça, é possível que entre os componentes reparadores existam lipídios insaturados.

A localização “*in loco*” dos lipídios saturados e insaturados ajudam no melhor entendimento sobre o papel funcional desse componente na larva infectante. O conhecimento proporcionado a partir deste estudo é sem dúvida uma importante ferramenta para que se possam traçar métodos de controle ainda mais específicos contra esta fase evolutiva do *S. mansoni*.

Para a detecção de proteínas a nível ultra-estrutural utilizamos duas técnicas citoquímicas: E-PTA e a prata amoniacal. Ambas as técnicas detectam proteínas básicas, mas possuem diferentes especificidades, o E-PTA revela proteínas ricas em histidinas e a prata amoniacal, arginina e lisina (SOUZA, 1998).

Utilizando a técnica de PTA identificamos a presença de proteínas básicas no tegumento, núcleo e nucléolo de células subtegumentares, corpos de inclusão e glândulas pré-acetabulares.

Como a E-PTA detecta proteínas ricas em histidina e estas estão comprometidas numa série de funções celulares tais como a diferenciação celular e a regulação da função gênica de células eucarióticas, a localização delas no núcleo e nucléolo de células subtegumentares só confirmam a especificidade da reação.

Dorsey et al. (2002) identificaram que corpos de inclusão, presentes no tegumento cercarial originam-se do complexo de golgi e apresentam como função a

formação da membrana heptalaminar externa. Como esta membrana apresenta em sua constituição proteínas, é possível que muitas delas sejam básicas por se originarem dos corpos de inclusão.

Segundo o estudo realizado por Stirewalt (1959) as glândulas pré-acetabulares apresentam secreções importantes na penetração da cercária no hospedeiro, tais secreções possuem ação proteolítica. De acordo com nossos resultados, a marcação de E-PTA nessas glândulas indicam a presença de proteínas básicas ricas em histidina que podem estar relacionadas no processo de penetração do hospedeiro.

Utilizando a técnica de prata amoniacal, identificamos uma forte marcação sobre toda a larva infectante. Evidenciamos também, marcações no núcleo de células musculares, tecido muscular circular e assim como a E-PTA, as glândulas pré-acetabulares também foram marcadas.

Os íons de cálcio desempenham papel de muita relevância em uma série de atividades celulares e estão envolvidos com a contração muscular, o movimento de cílios e flagelos, despolarização, secreção, ativação de microtúbulos e microfilamentos, endocitose e exocitose (SOUZA, 1998).

Apesar de haver alguns trabalhos sobre a presença do cálcio na cercária, nenhum fez esta abordagem ultra-estruturalmente. A elucidação da localização de depósitos de cálcio na larva infectante em nível ultra-estrutural seria de extrema importância, pois evidenciaria com detalhe a distribuição do íon e dessa forma torna-se possível correlacionar a localização "*in loco*" com a função.

Em nosso trabalho ficou evidente a presença de cálcio em toda a região interna da cercária. De acordo com a marcação, o íon está distribuído de forma regular, e parece demarcar os espaços internos da larva infectante.

O cálcio foi evidenciado também nas glândulas pré-acetabulares (dados não mostrados). Utilizando técnicas histoquímicas vários trabalhos identificaram a presença de cálcio nas glândulas pré-acetabulares (GORDON; GRIFFITH, 1951; STIREWALT, 1959). De acordo com Dresden e Asch (1977) o cálcio encontrado na glândula está combinado formando o carbonato de cálcio. Este achado está embasado na análise da secreção da glândula e na análise físico-química da cercária.

Vários estudos indicaram que o complexo enzima-secreção da cercária de *S. mansoni* são responsáveis pelas alterações histológicas e histoquímicas do extrato córneo e conexões acelulares das barreiras teciduais do hospedeiro durante a passagem tecidual pela pele (LEWERT, 1958; STIREWALT, 1963). Existem várias evidências de que algumas dessas enzimas estão presentes nas glândulas pré-acetabulares e possuam ação proteolítica (STIREWALT, 1959). Alguns trabalhos têm levantado a possibilidade dos íons de cálcio atuarem como ativadores enzimáticos nesse processo.

A coloração seletiva de Alizarin Red S (ARS) pela glândula pré-acetabular sugere que os íons de cálcio estão presentes na glândula. Utilizando Schiff Base, glyoxal- bis (2 hydroxylanil), ou GBHA para a detecção citoquímica de íons de cálcio foi evidenciado a presença do íon nas glândulas pré-acetabulares e ductos de *S. mansoni*, tal método é até mais específico para a detecção de íons de cálcio do que o ARS (LEWERT et al., 1966).

A observação do material liberado da cercária de *S. mansoni* após o estímulo confirma as diferenças físicas e histoquímicas da composição das glândulas pré e pós-acetabular. Essas diferenças no conteúdo das duas glândulas refletem as diferenças na função, pois a secreção da glândula pós-acetabular tem função adesiva, de proteção e ação enzimática, em contraste com a função lítica do conteúdo liberado pela glândula pré-acetabular (LEWERT et al., 1966).

Utilizando técnicas físico-químicas Dresden e Edlin (1975) encontraram que cada cercária apresenta em média cerca de 10 a 15ng de cálcio.

De acordo com Lewert e Lee (1954) o cálcio e/ou magnésio apresentam funções similares. De acordo com os autores eles podem desempenhar funções semelhantes à de uma co-enzima ou serem ativadores de enzimas líticas localizadas na secreção da glândula. Além disso, existe uma correlação *in vitro* do efeito do cálcio, magnésio e íons de zinco na atividade enzimática da cercária de *S. mansoni*, e o efeito *in vivo* na atuação desses íons durante a penetração. Nesse estudo foi constatado que o sucesso na penetração da cercária depende da concentração de íons na água. Isso pode explicar, em parte, as diferentes taxas de infecção encontradas em vários laboratórios.

Murrel et al (1983) relacionaram a presença de grupamentos carregados negativamente na superfície de helmintos com a proteção contra a dessecação. Por outro lado, é possível que tais grupamentos ativem o sistema complemento via fator de Hageman ou fator VII da coagulação, e conseqüentemente, desencadeando reações inflamatórias.

Utilizando ferritina cationizada, pH 7,2 observamos a presença de sítios aniônicos associados com a camada externa da larva. Esses resultados são similares aos observados em outros helmintos: L3 de *Wuchereria bancrofti* (SILVA et al 2006) e *Strongyloides ratti* and *Trichinella spirallis* (MURREL et al. 1983).

O tratamento das amostras com a neuraminidase seguido de incubação com ferritina cationizada não alterou o padrão de marcação dessas partículas na superfície do trematóide. Nossa observação utilizando a neuraminidase de elevada especificidade indica que grupamentos carboxílicos não estão envolvidos na carga de superfície da cercária de *S. mansoni*. Estes resultados estão de acordo com o que foi observado por Himmelhoch e Zucherman (1978) trabalhando com *C. briggsae*.

O tratamento com tripsina resultou numa ausência de marcação, esta observação indica que ao contrário do que é encontrado em outros sistemas biológicos, as glicoproteínas sensíveis a tripsina devem estar contribuindo de forma significativa na superfície negativa da cercária.

Os resultados também evidenciam que o tratamento nas cercárias *in vivo* com condroitinase AB, que possui especificidade para condroitina-4-sulfato e dermatan sulfato (B) inibe a ligação com partículas cationizadas de ferritina. Esta observação sugere que a presença de glicosaminoglicanas no tegumento da cercária de *S. mansoni*. Porém, mais estudos bioquímicos são necessários para confirmar esta observação citoquímica.

Através da análise de proteínas básicas, cálcio e grupamentos aniônicos na cercária de *S. mansoni* pudemos concluir que a localização desses compostos está fortemente relacionados às diversas funções da larva que vão desde a locomoção para encontro do hospedeiro até mesmo a sobrevivência dessas cercárias no ambiente.

CONCLUSÕES

1. Lipídios saturados foram evidenciados nos músculos circulares, principalmente na linha Z. Além da marcação muscular foi observada uma reação bem distribuída delimitando alguns compartimentos da larva infectante.

2. Lipídios insaturados foram encontrados em todo tegumento, glândula da cabeça, glândula pré-acetabular e corpos de inclusão da cercária de *S. mansoni*. Provavelmente estão relacionados ao processo de locomoção, aproximação com o hospedeiro, proteção contra a perda de líquidos além de ter um papel hidrostático.

3. Através da técnica de PTA identificamos a localização de proteínas básicas no tegumento, núcleo e nucléolo de células subtegumentares, corpos de inclusão e glândulas pré-acetabulares. Utilizando a técnica de prata amoniacal identificamos a localização de proteínas básicas sobre toda a larva infectante, núcleo de células musculares, tecido muscular circular e nas glândulas pré-acetabulares.

4. Sítios celulares que contém cálcio foram identificados na cercária de *S. mansoni* e estão distribuídos de forma uniforme nos espaços internos.

5. Através de ferritina cationizada foi possível evidenciar a presença de sítios aniônicos na superfície da larva infectante de *S. mansoni*. A ausência de marcação após o tratamento enzimático com tripsina e condroitinase AB indicam que glicoproteínas e glicosaminoglicanos específicos para tripsina e condroitinase respectivamente podem estar conferindo a carga aniônica.

REFERÊNCIAS

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

ALMEIDA, Y. M. et al. Movimentos migratórios e a expansão da esquistossomose no Estado do Ceará. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, São Paulo, v. 33, n. 48, supl. 1, p. 725-728, 1991.

ALVES, P. C. et al. A experiência da esquistossomose e os desafios da mobilização comunitária. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 4, supl. 2, p. 79-90, 1998.

ARAUJO, A. C. G. et al. Scanning electron microscopy of adult *Wuchereria bancrofti* (Nematoda: Filarioidea), **J. Parasitol.**, Lawrence, v. 81, n. 3, p. 468-474, 1995.

AXMANN, C. Morphological studies on glycogen deposition in schistosomes and other flukes, **J. Morphol.**, Philadelphia, v. 80, p. 321-343, 1947.

BARATA, C. H. et al. Novo foco de esquistossomose mansoni em sacramento, Alto do Parnaíba, Minas Gerais, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Brasília, v. 33, supl. 1, p. 379, 2000.

BARBOSA, C. S. et al. Ecoepidemiologia da esquistossomose urbana na ilha de Itamaracá, Pernambuco. **Rev. Saúde Pública**. São Paulo, v. 34, p.337-341, 2000.

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

BARBOSA, C. S. et al. An outbreak of acute schistosomiasis at Porto de Galinhas beach, Pernambuco, Brazil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 3, p. 725-728, maio/jun. 2001.

BARRETO, M. L. Use of risk factors obtained by questionnaires in the screening for *Schistosoma mansoni* infection. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 48, p. 742-747, 1993.

BENNETT, B. M. Optimum Moving Averages for the Estimation of Median Effective Dose in Bioassay. **J. Hyg.**, Londres, v. 61, p. 401-406, Dec. 1963.

BRADSHAW, H. B.; WALKER, J. M. The expanding field of cannabimimetic and related lipid mediators. **Br. J. Pharmacol.**, London, v. 144, p. 459-465, 2005.

CARVALHO, O. S.; NUNES, I. M.; CALDEIRA, R. L. First report of *Biomphalaria glabrata* in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, v. 93, p. 39-40, 1998.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL. Schistosomiasis. Atlanta. 2004. Disponível em: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Schistosomiasis.htm>. Acesso em: 14/12/2007.

CHENG, T. C.; BIER, J. W. Studies on molluscan schistosomiasis: an analysis of the development of the cercaria of *Schistosoma mansoni*. **Parasitology**, London, v. 64, p. 129-141, 1972.

COUSIN, C. E.; DORSEY, C. H. Nervous system of *Schistosoma mansoni* cercaria: organization and fine structure. **Parasitol. Res.**, Berlin, v. 77, n. 2, p. 132-141, 1991.

COUTINHO, E. M. et al. Factors involved in *S. mansoni* infection in rural areas in Northeast Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 92, p. 707-715, 1997.

DANON, D. et al. Use of cationized ferritin as a label of negative charges on cell surfaces. **J. Ultrastruct. Res.**, New York, v. 38, n. 5, p. 500-510, mar. 1972.

SOUZA, W. **Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicada às ciências biológicas** [S. I.]: Sociedade Brasileira de Microscopia, 1998. 179f.

SOUZA, W. et al **Manual sobre técnicas básicas em microscopia eletrônica**. Vol. I - Técnicas básicas [S.I.]: Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, 1989. 105f.

SOUZA, W. Fine structure and localizations of anionic sites on the surface of microfilária of *Wuchereria bancrofti*. **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.**, Bologna, v. 21, n. 1, p. 121-129, 1989.

SOUZA, W. Microscopy and cytochemistry of the biogenesis of the parasitophorous vacuole. **Histochemical Cell Biology**, Berlin, v. 123, n. 1, p. 1-18, 2005.

DEI-CAS, E.; DHAINAUT-COURTOIS, N.; VERNES, A. Contribution a l'étude du système nerveux des formes adultes et larvaires de *Schistosoma mansoni*. **Ann. Parasitol. Hum. Comp.**, Paris, v. 55, p. 69-86, 1980.

DORSEY, C. H. et al. Ultrastructure of the *Schistosoma mansoni* cercaria. **Micron**, Oxford, v. 33, n. 3, p.279-323, 2002.

DORSEY, C. H. *Schistosoma mansoni*: Description of the head gland of cercariae and schistosomules at ultrastructural level. **Exp. Parasitol.**, New York, v. 39, p. 444-459, 1976.

DORSEY, C. H.; COUSIN C. E. *Schistosoma mansoni*: A new parenchymal cell in cercariae. **Exp. Parasitol.**, New York, v. 61, p. 33-41, 1986.

DORSEY, C. H.; STIREWALT, M. A. *Schistosoma mansoni*: Fine structure of cercarial acetabular glands. **Exp. Parasitol.**, New York, v. 30, p. 199-214, 1971.

DRESDEN, M. H.; ASCH, H. L. Calcium carbonate content of the preacetabular glands of *Schistosoma mansoni* cercariae. **J. Parasitol.**, Lawrence, v. 63, n. 1, p. 163-165, 1977.

DRESDEN, M. H.; EDLIN, E. M. *Schistosoma mansoni*: Calcium content of cercariae and its effects on protease activity in vitro **J. Parasitol.**, Lawrence, v. 61, n. 3, p. 398-402, 1975.

EBRAHIMZADEH, A. Development, histology and histochemistry of the glandular system of the cercaria of *Schistosoma mansoni* Sambon (1907). **Z. Parasitenkd.**, Berlin, v. 34, n. 4, p. 319-342, 1970.

EBRAHIMZADEH, A.; KRAFT, M. Ultrastructural studies on the morphology of the cercariae *Schistosoma mansoni*. I. The alimentary tract. **Z. Parasitenkd.**, Berlin, v. 32, n. 2, p. 157-175, 1969.

EBRAHIMZADEH, A.; KRAFT, M. Ultrastrukturelle Untersuchungen zur Anatomie der Cercarien von *Schistosoma mansoni* II. Das Drusensystem **Z. Parasitenkd.**, Berlin, v. 36, p. 265-290, 1971.

FAUST, E. C. Life-history studies on Montana trematodes. **III Biol. Monogr**, Urbana, v. 4, p. 1-121, 1917.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. Vigilância epidemiológica das doenças de transmissão hídrica **Bol. Epidemiológico**. v. 17, n. 20, p. 7-12, 2001.

GARAMVOLGYI, N. On the role of the Z-lines in the insect flight muscle. **Acta Biochim. Biophys Acad. Sci. Hung.**, Budapeste, v. 3, p. 77, 1968 .

GARAMVOLGYI, N. The arrangement of the myofilaments in the insect flight muscle I. **J. Ultrastruct. Res.**, New York, v. 13, n. 409, 1965

GAZZINELLI, G. et al. *Schistosoma mansoni*: biochemical evidence for morphogenetic change from cercaria to schistosomule. **Exp. Parasitol.**, New York. v. 34, n. 2, p. 181-188, Oct, 1973.

GINECINSKIJ, T. A. The dynamics of the storage of fat in the course of the life cycle of trematodes. **Dokl. Akad. Nauk.**, Moskva SSSR, v. 139, p. 1016-1019, 1961.

GORDON, R. M.; DAVEY, T. H.; PEASTON, H. The transmission of human Bilharziasis in Sierra Leone, with an account of the lifecycle of the schistosomes concerned, *S. Mansoni* and *S. Haematobium*. **Ann. Trop. Med. Parasitol.** Liverpool, v. 28, p. 323-418, 1934.

GORDON, R. M.; GRIFFITH, R. B. Observations on the means by which the cercariae of *Schistosoma mansoni* penetrate mammalian skin, together with an account of certain morphological changes observed in newly penetrated larvae. . **Ann. Trop. Med. Parasitol.** Liverpool, v. 45, p. 227-243, 1951.

HARSANYI, V.; GARAMVOLGYI, N. On the Z-substance of striated muscle. **Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.**, Budapeste, v. 4, n. 259, 1969.

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

HIMMELHOCH, S.; ZUCKERMAN, B. M. *Caenorhabditis briggsae*: aging and the structural turnover of the outer cuticle surface and the intestine. **Exp. Parasitol.**, New York, v. 45, n. 2, p. 208-214, Aug, 1978.

HOCKLEY, D. J.; MCLAREN, D. J. *Schistosoma mansoni*: changes in the outer membrane of the tegument during development from cercaria to adult worm. **Int. J. Parasitol.**, New York, v. 3, n. 1, p. 13-25, Jan. 1973.

HOCKLEY, D. J. *Schistosoma mansoni*: the development of the cercarial tegument. **Parasitology**, London, v. 64, n. 2, p. 245-52, Apr. 1972.

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

HURST, C. T. Structural and functional changes produced in gastropod mollusk, *Physa accidentalis*, in the case of parasitism by the larvae of *Echinostoma revolutum*, **U. Cal. Publ. Zool.**, [S.l.], v. 29, p. 51-57, 1927.

IVANOV, I. I. On the byochemistry of the muscular apparatus of helminths. **Trusdy, Vsesoiuz**, v. 4, p. 51-57, 1950.

KALIFE, J. et al. Mechanisms of resistance to *S. mansoni* infection: the rat model. **Parasitol. Int.**, Amsterdam, v. 49, p. 339-345, 2000.

KATZ, N.; ALMEIDA, K. **Cienc. Cult.**, São Paulo, v. 55, n. 1, p. 38-41, jan./mar. 2003.

KATZ, N. Experiências com quimioterapia em grande escala no controle da esquistossomose no Brasil. **Rev. Inst. de Med. Trop. São Paulo**, São Paulo, v. 22, p. 40-51, 1980.

KEMP, W. M. Ultrastructure of the Cercarienhüllen Reaktion of *Schistosoma mansoni* **J. Parasit.**, Lawrence, v. 56, p. 713-723, 1970.

KENT, P. W. Structure and function of glycoproteins. In: CAMPBELL, P. N.; GRENVILLE, G. D. (Ed.). **Essays in Biochemistry**, London: Academic press, 1967. v. 3, p. 105-151.

KRUIDENIER, F. J. The formation and function of mucoids in virgulate cercariae, including study of the virgula organ. **Am. Midl. Nat.**, Notre Dame, v. 46, p. 660-683, 1951.

KRUIDENIER, F. J. Studies on the formation and function of mucoide glands in cercariae: opisthorchoid cercariae. **J. Parasit.**, Lawrence, v. 39, p. 385-391, 1953a.

KRUIDENIER, F.J. Studies on the formation and function of mucoide glands in cercariae: non-virgulate xiphodiocercariae. **Am. Midl. Nat.**, Notre Dame, v. 50, p. 382-396, 1953b.

KRUIDENIER, F. J. Ultrastructure of the excretory system of cercariae. **J. Parasitol.**, Lawrence, v. 45, n. 59, p. 45-81, 1959.

KRUIDENIER, F.J.; VATTER, A. E. Microstructure of muscles in cercariae of digenetic trematodes *Schistosoma mansoni* and *Tetrapapillatrema concavocarpa*. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ELECTRON MICROSCOPY, 4., 1960, Berlin. **Proceedings**. [S.l.: s. n.], 1960. v. 2, p. 332-335.

KUNTZ, R. E. Embryonic development of the excretory system in forktailed cercariae of the schistosomes and in a blunt-tailed *Brachylaemid cercaria*. **Trans. Am. Microsc. Soc.**, Lawrence, v. 69, p. 1-20, 1950.

LESCANO, S. Z. Atividade antiparasitária do artemether na esquistossomose mansônica experimental Antischistosomal activity of artemether in experimental *Schistosomiasis mansoni*. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 38, n. 1, p. 71-75, 2004.

LEWERT, R. M.; HOPKINS D. R.; MANDLOWITZ, S. The role of calcium and magnesium ions in invasiveness of schistosome cercariae. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 15, n. 3, p. 314-323, may 1966.

LEWERT, R. M. Invasiveness of Helminth Larvae. **Rice Inst. Pamph.**, [S.l.], v. 45, n. 1, p. 97-113, 1958.

LEWERT, R. M.; LEE, C. L. Studies on the passage of helminth larvae through host tissues. I. Histochemical studies on the extracellular changes caused by penetrating larvae. II. Enzymatic activity of larvae in vitro and in vivo. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v. 95, n. 1, p.13-51, Jul./Aug. 1954.

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

MALAGUEÑO E.; SANTANA J. V. Etiologia. In: MALTA, J. **Esquistossomose mansônica**. Recife: Ed. Universitária da UFPE, 1994. p. 26-40.

MARCHIORI, C. H. First occurrence of *Biomphalaria straminea* in the South Goiano, Brazil, **Rev. Saúde Pública**. São Paulo, v. 33, n.6, p. 622-623, dez. 1999.

MELO, A. L.; COELHO, P. M. Z. Schistosoma mansoni e a doença. In: NEVES, D. P. et al. **Parasitologia Humana**. 11. Ed., São Paulo: Atheneu, 2005, p. 193-221.

MELO, D. P.; GENARO, O. Esquistossomose. In: REY, L. **Parasitologia** 3. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001, p. 204-223.

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

MORRIS, G. P. The fine structure of the tegument and associated structures of the cercaria of *Schistosoma mansoni*. **Z. Parasitenkd.**, Berlin, v.36, p. 15-31, 1971.

MURRELL, K. D.; GRAHAM, C. E.; MCGREEVY, M. *Strongyloides ratti* and *Trichinella spiralis*: net charge of epicuticle. **Exp. Parasitol**, New York, v. 55, n. 3, p. 331-339, 1983.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Report of the WHO informal consultation on schistosomiasis control**. Geneva, 1998. (Document WHO/CDS/CPC/SIP/99.2).

OSCHMAN, J. L.; WALL, B. J. Calcium binding to intestinal membranes. **J. Cell. Biol.**, New York; v. 55, n. 1, p. 58-73, Oct. 1972.

- PAN, S. C. The fine structure of the miracidium of *Schistosoma mansoni*. **J. Invertebr. Pathol.** New York, v. 36, n. 3, p. 307-372, Nov. 1980.
- PARAENSE, W. L. Fauna planorbídica do Brasil. In: BLUCHER E. (Ed.) **Introdução à Geografia Médica do Brasil**. São Paulo: [S.n.], 1972. p. 213-239.
- POWER, E. C.; SOGANDARES-BERNAL, F. The role of ultrastructural studies of evolutionary biology of trematodes, **J. Parasit.**, Lawrence, v. 56, n. 4, p. 270, 1970.
- PROUDFOOT, L. et al. Rapid changes in the surface of parasitic nematodes during transition from pre-to post-parasitic forms. **Parasitology**, London, v. 107, p. 107-117, 1993a.
- PROUDFOOT, L. et al. External stimuli and intracellular signalling in the modification of the nematode surface during transition to mammalian host environment. **Parasitology**, London, v.107, p. 559-566, 1993b.
- RACE, G. J. et al. Scanning and transmission electron microscopy of *Schistosoma mansoni* eggs, cercariae and adults. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 20, p. 914-924, 1971.
- RIBEIRO, P. J. *et al.* Programa educativo em esquistossomose: modelo de abordagem metodológica. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 38, n. 3, p. 415-421, 2004.
- RIFKIN, E. An ultrastructural study of the interaction between the sporocysts and the developing cercariae of *Schistosoma mansoni*. **J. Parasit.**, Lawrence, v. 56, n. 4, p. 284, 1970.
- ROBSON, R. T.; ERASMUS, D. A. The ultrastructure, based on stereoscan observations, of the oral sucker of the cercaria of *Schistosoma mansoni*. **Z. Parasit. Kd.**, Berlin, v. 35, p. 76-86, 1970.
- SCHNEIDER, O.; ZELCK, U. E. Differential display analysis of hemocytes from schistosome-resistant and schistosome-susceptible intermediate hosts. **Parasitol. Res.**, Berlin, v. 87, n. 6, p.489-491, Jun. 2001.
-

SHIFF, C. J. et al. The influence of human skin lipids on the cercarial penetration responses of *Schistosoma haematobium* and *Schistosoma mansoni*. **J. Parasitol.**, Lawrence, v. 58, n. 3, p. 476-480, Jun. 1972.

SHORT, R. B.; CARTRETT, M. L. Argentophilic "papillae" of *Schistosoma mansoni* cercariae. **J. Parasit.**, Lawrence, v. 59, n. 1041-1059, 1973.

SILVA, A. et al. Aspectos clínicos de um surto de esquistossomose aguda no Estado de Sergipe, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Brasília, v. 33, supl. 1, p. 376, 2000.

SILVA, L. F. et al. Cytochemical characterization of the third-stage larva of *Wuchereria bancrofti* (Nematoda: Filarioidea). **Parasitol. Res.**, Berlin; v. 99, n. 1, p.14-20, Jun. 2006.

SOUZA, C. P.; JANNOTTI-PASSOS, L. K.; FREITAS, J. R. Degree of host-parasite compatibility between *Schistosoma mansoni* and their intermediate molluscan hosts in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 90, p. 5-10, 1995.

SPICER, S. S.; HARDIN, J. H.; GREENE, W. B. Nuclear precipitates in pyroantimonate-osmium tetroxide-fixed tissues. **J. Cell. Biol.**, New York, v. 39, n. 1, p. 216-221, Oct. 1968.

STEIN, P. C.; LUMSDEN, R. D. *Schistosoma mansoni*: topochemical features of cercariae, schistosomula, and adults. **Exp. Parasitol.**, New York, v. 33, n. 3, p. 499-514, Jun. 1973.

STIREWALT, M. A.; DORSEY, C. H. *Schistosoma mansoni*: cercarial penetration of host epidermis at the ultrastructural level. **Exp. Parasitol.**, New York; v. 35, n. 1, p. 1-15, Feb. 1974.

STIREWALT, M. A. Cercaria vs. schistosomule (*Schistosoma mansoni*): absence of the pericercarial envelope in vivo and the early physiological and histological metamorphosis of the parasite. **Exp. Parasitol.**, New York, v. 13, p. 395-406, Jun. 1963.

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

STIREWALT, M. A. Skin penetration mechanisms of helminths. In: SOULSBY, E. J. L. (Ed.). **Biology of Parasites**. [S.l.]: Academic Press, 1966, p. 41-59.

STIREWALT, M. A.; DORSEY, C. H. Schistosomiasis and *Schistosoma mansoni*. **US. Navy. Med.**, Washington DC, v. 61, p. 5-19, 1973.

STIREWALT, M. A.; KRUIDENIER, F. J. Activity of the acetabular secretory apparatus of cercariae of *Schistosoma mansoni* under experimental conditions. **Exp. Parasitol.**, New York, v. 11, p. 191-211, Sep. 1961.

STIREWALT, M. A.; WALTERS, M. *Schistosoma mansoni*: histochemical analysis of the postacetabular gland secretion of cercariae. **Exp. Parasitol.**, New York, v. 33, n. 1, p. 56-72, Feb. 1973.

STIREWALT, M. A. Isolation and characterization of deposits of secretion from the acetabular gland complex of cercariae of *Schistosoma mansoni*. **Exp. Parasitol.**, New York, v. 8, p. 199-214, 1959.

TAKAHASHI, K. et al. Identification of lipids as the main component of skeletal muscle Z-discs. **J. Muscle Res. Cell Motil.**, London, v. 22, n. 4, may 2001.

UNIVERSITÄT BIELEFELD. ***Schistosoma mansoni* - Erreger der Bilharziose**. Limburg. 2006. Disponível em: http://www.uni-bielefeld.de/biologie/Didaktik/Zoologie/html_deutsch/zyklus.html Acesso em: 12/12/2007.

UNIVERSITY OF CAMBRIDGE. **The Schistosome Egg**. Cambridge. 1998. Disponível em: <http://www.path.cam.ac.uk/%7Eschisto/SchistoLife/S.mansoni.egg.html>. Acesso em: 14/12/2007.

VOGEL, H.; MINNING, W. Hüllenbildung bei Bilharzia-Cercarien im Serum bilharzia-infizierter Tiere und Menschen, **Z. Bakt. Parasite Abt.**, [S.l.], v. 153, p. 91-105, 1949.

XIMENES, R. A. A. et al. Migration and urban schistosomiasis. The case of São Lourenço da Mata, Northeast of Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, São Paulo, v. 42, n. 4, p. 209-217, 2000.

ANEXOS

ANEXO A: Parecer da Comissão de Ética



Título do Projeto: Caracterização citoquímica ultra-estutural da cercária de *Schistosoma mansoni*

Pesquisador responsável: Marília Gabriela dos Santos Cavalcanti

Instituição onde será realizado o projeto: CPqAM/Fiocruz

Data de apresentação ao CEP: 08/10/2007

Registro no CEP/CPqAM/FIOCRUZ: 77/07

Registro no CAAE: 0077.0.095.000-07

PARECER

O CEP/CPqAM avaliou as modificações introduzidas e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com o Código de Ética Brasileiro, resolução CNS 196/96 e complementares.

Este parecer tem validade até 10 de dezembro de 2012 e em caso de necessidade de renovação do mesmo, encaminhar relatório e atualização do projeto.



Recife, 10 de dezembro de 2007.


Drª Zuleide de Medeiros
Coordenadora
CEP/CPqAM/FIOCRUZ

ANEXO B: Confirmação de Submissão do Artigo, Revista: Parasitology**Submission
Confirmation**

Thank you for submitting your manuscript to *Parasitology*.

Manuscript ID:	PAR-2007-0384
Title:	Cytochemical characterization of lipids in the cercaria of <i>Schistosoma mansoni</i>
Authors:	Cavalcanti, Marília Araújo, Helena Paiva, Marcelo Barbosa, Constança Nascimento, Robson Lima-Filho, José Brayner, Fabio Alves, Luiz
Date Submitted:	25-Dec-2007

 Print  Return to Dashboard