

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

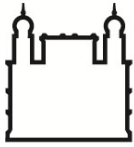
INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

ROBERTO CARLOS FERREIRA JOÃO

***SCHISTOSOMA MANSONI* (TREMATODA: DIGENEA)**
SAMBON 1907: DIAGNÓSTICO ULTRAESTRUTURAL E
LABORATORIAL

RIO DE JANEIRO

2011



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

ROBERTO CARLOS FERREIRA JOÃO

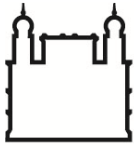
***SCHISTOSOMA MANSONI* (TREMATODA: DIGENEA) SAMBON, 1907:
DIAGNÓSTICO ULTRAESTRUTURAL E LABORATORIAL**

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

Orientadora: Prof. Dra. Cláudia Portes Santos Silva

RIO DE JANEIRO

2011



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

ROBERTO CARLOS FERREIRA JOÃO

SCHISTOSOMA MANSONI (TREMATODA: DIGENEA) SAMBON, 1907:
DIAGNÓSTICO ULTRAESTRUTURAL E LABORATORIAL

Orientadora: Prof. Dra. Cláudia Portes Santos Silva

Aprovada em: 20/12/2011

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Helene Santos Barbosa- Instituto Oswaldo Cruz

Prof. Dr. José Luis Luque Alejos- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Arnaldo Maldonado Jr.- Instituto Oswaldo Cruz

Prof. Dra. Mirian Cláudia de Souza - Instituto Oswaldo Cruz

Prof. Dra. Clélia Christina Mello-Silva - Instituto Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro, 20 de dezembro de 2011.

João, Roberto Carlos Ferreira

Schistosoma mansoni (Trematoda: Digenea) Sambom, 1907: diagnóstico ultraestrutural e laboratorial./ Roberto Carlos Ferreira João. Rio de Janeiro: 2012.

xiv, 50p; il.

Dissertação de Mestrado. Instituto Oswaldo Cruz, Biologia Parasitária, 2011.

1. *Schistosoma mansoni* 2. ultraestrutura 3. confocal 4. diagnóstico laboratorial modificado

O presente trabalho foi realizado sob a orientação da Professora Dra. Cláudia Portes Santos Silva no Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental em colaboração com Dra. Clélia Christina Correia de Mello Silva, do Laboratório de Esquistossomose Experimental (LEE) do Instituto Oswaldo Cruz/IOC.

Este trabalho é parte do acordo de Cooperação internacional entre o Instituto Oswaldo Cruz/ Fiocruz/ República Federativa do Brasil e Fundação Eduardo dos Santos (FESA) de Angola.

Direção do Hospital Central Dr. António Agostinho Neto do Estado da Huíla,
Município de Lubango (Angola);

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq

Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro -
FAPERJ

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES

Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz - IOC/FIOCRUZ

Data de ingresso no Programa de Mestrado em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz: Março 2010

RESULTADOS PARCIAIS DA DISSERTAÇÃO

Resumos apresentados em Congressos Nacionais

João, RCF, Santos, CP, Mello-Silva, CC. “Avaliação da sensibilidade da técnica de Kato-Katz no Diagnóstico da esquistossomose mansônica em infecções laboratoriais. *In*: XXII Congresso Brasileiro de Parasitologia, São Paulo-SP. Livro de Resumos, 2011 p. 127, meio digital.

João, RCF, Veiga, JL, Santos, CP. “Estudos taxonômicos de *Schistosoma mansoni* e *Schistosoma haematobium* no âmbito da cooperação Brasil-Angola”. *In*: 1º Simpósio Nacional de Taxonomia e Biodiversidade, Rio de Janeiro-RJ, 2009 p. 61, meio digital.

João, RCF, Mello-Silva, CC, Barbosa, HS, Santos, CP. “Comparative study of tubercles of male *Schistosoma mansoni* using transmission electron microscopy and confocal laser microscopy”. *In*: XXIII Congresso da Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise, realizado, Búzios – RJ, 2011, trabalho 17010, meio digital.

Resumos apresentados em Congressos Internacionais

João, RCF, Mello-Silva, CC, Costa, VS, Santos, CP. “Comparative study of the tubercles of male *Schistosoma mansoni* using confocal laser and scanning electron microscopy”. *In*: 12º Simpósio Internacional sobre Esquistossomose, Rio de Janeiro-RJ, 2010 p.102.

Aos meus queridos pais Eugênia e Fernando por me terem dado a vida, amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por guiar sempre os meus passos.

À minha orientadora Dra. Cláudia Portes Santos Silva, pesquisadora do Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental (LAPSA) - IOC/FIOCRUZ, por me ter dado desde o início o voto de confiança, abrindo as portas para o mundo da ciência, mesmo sabendo das minhas limitações nessa área, confiou ensinando-me a subir degrau por degrau nessa área fascinante que é a pesquisa. Por estar sempre comigo nos momentos mais difíceis da minha vida, pela amizade, carinho, e competência profissional fantástica, lhe sou eternamente grato.

À Susana Balmant Emerique Simões pela ajuda e paciência em ensinar-me a executar pela primeira vez a técnica do Kato – Katz. À Karina Corrêa Lopes, Viviane Costa, Everton Gustavo, Luíz Felipe, Juliana Borges, Daniele Miranda e Marly de Mello, pela preciosa ajuda e paciência no decorrer da elaboração deste trabalho. À Dra. Helena Santos, tecnologista do Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental do IOC/FIOCRUZ, pela palavra sempre amiga e encorajadora.

Ao Dr. Darcílio Baptista, pesquisador e chefe do Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental (LAPSA) - IOC- FIOCRUZ, pela amizade e atenção e à Dra Magali Barreto, pesquisadora do mesmo Laboratório, pela ajuda prestada.

À Dra Clélia Christina Correia de Mello Silva, pesquisadora do Laboratório de Esquistossomose Experimental (LEE) - IOC/FIOCRUZ, pela valiosíssima parceria no diagnóstico laboratorial da esquistossomose intestinal, além do apoio moral e amizade. Aos técnicos do referido laboratório Paula Silva, Eliane de La Plata Ruiz, Sr. João Gandara, Ronaldo de Carvalho Augusto e Aroldo Gomes, pela entrega, contribuição e companheirismo durante a parte prática deste trabalho;

Aos profissionais da plataforma de microscopia eletrônica do IOC, Dra. Helene Santos Barbosa e Dra. Susana Côrte Real, pesquisadoras do Laboratório de Biologia Ultraestrutural do IOC/FIOCRUZ, pela simpatia e atenção e aos técnicos, Sandra Maria de Oliveira Souza, Rômulo Custódio dos Santos, Genésio Lopes Faria, Generval Luciano Batista, Thaís Sequeira, Viviane Souza de Campos, pela disponibilidade e atenção.

Ao Pedro Paulo de Abreu Manso, pela ajuda, amizade e disponibilidade a quando da microscopia a laser confocal; ao Lucas Portes Fernandes e ao Maurício Portes Santos pela ajuda na editoração das fotos e legendas.

Aos meus queridos e saudosos colegas da turma do curso de Mestrado de Biologia Parasitária 2010/2012 do IOC/FIOCRUZ, pela simplicidade, carinho, amizade e solidariedade.

Aos meus amigos e colegas Angolanos, Elsa Paula Daniel, Flaviana Marina, Gabriel Natal Pinto e Afonso Zola pela paciência, pois juntos vivemos e compartilhamos momentos bons e ruins em todos esses anos de formação no Brasil.

Às amigas construídas no Brasil, pela inesquecível receptividade, carinho, companheirismo e ajuda.

Aos meus irmãos, Paula Maria João, António Fernando João, Cristina Isabel João dos Santos Rôxo, Leopoldo Joaquim João, Maria Eduarda Ferreira João e Ruth Maria João, pelo afeto e ajuda, à minha sobrinha querida, Paula Cristina Santos Rôxo, pela forma carinhosa como sempre me tratou e aos meus tios e primos pelo carinho.

Ao Dr. João de Deus, (FESA)-Angola e Dra. Maria de Fátima Ferreira da Cruz Fiocruz/ IOC Brasil, pelo convênio estabelecido proporcionando a minha formação na Pós-graduação. Ao Dr. Manuel Damião representante da FESA no Brasil pela disponibilidade e amizade.

Meu agradecimento especial aos dirigentes da Fundação Oswaldo Cruz e do Instituto Oswaldo Cruz pelo apoio constante durante minha estadia no Brasil.

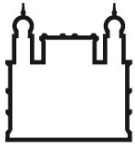
SUMÁRIO

| | |
|--|-------------|
| LISTA DE FIGURAS E TABELAS | xi |
| RESUMO | xiii |
| ABSTRACT | xiv |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 Considerações gerais | 1 |
| 1.2 Ciclo Evolutivo | 2 |
| 1.3 Ultraestrutura | 4 |
| 1.4 Diagnóstico laboratorial | 4 |
| 2. JUSTIFICATIVA | 6 |
| 3. OBJETIVOS | 7 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 8 |
| 4.1 Obtenção de amostras de ovos e adultos de <i>S. mansoni</i> | 8 |
| 4.2 Microscopia de Luz (ML) | 8 |
| 4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) | 9 |
| 4.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) | 9 |
| 4.5 Microscopia a Laser Confocal (MLC) | 9 |
| 4.6 Diagnóstico laboratorial | 10 |
| 4.6.1 Método de Kato-Katz | 10 |
| 4.6.2 Exames de fezes com técnica experimental baseada no fixador SAF | 10 |
| 4.6.3 OPG comparativo de duas técnicas coproparasitológicas em infecções experimentais diferentes | 11 |
| 4.6.4 Tratamento Estatístico | 11 |
| 5. RESULTADOS | 12 |
| 5.1 Diagnóstico ultraestrutural | 12 |
| 5.2 Diagnóstico laboratorial | 23 |
| 6. DISCUSSÃO | 41 |
| 7. CONCLUSÕES | 45 |
| 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 46 |

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

| | | |
|-----------------------|--|----|
| Figs 1.1-1.2 | 1.1 Mapa da distribuição da esquistossomose. 1.2 Ciclo da esquistossomose | 3 |
| Figs 5.1-5.2 | <i>S. mansoni</i> . Microscopia de luz (ML). 5.1. Fêmea parcialmente deitada no canal ginecóforo do macho. 5.2. Região anterior do macho. | 13 |
| Figs 5.3-5.5 | <i>S. mansoni</i> . Microscopia eletrônica de varredura (MEV). 5.3. Fêmea no canal ginecóforo do macho. 5.4. Ventosa ventral da fêmea. 5.5. Região dorsal da fêmea. | 14 |
| Figs 5.6-5.7 | <i>S. mansoni</i> . MEV. 5.6. Casal com fêmea de corpo fino e macho com tegumento rugoso. 5.7. Macho com canal ginecóforo. | 15 |
| Figs 5.8-5.10 | 5.8 <i>S. mansoni</i> . MEV. Região anterior do macho com ventosa oral subterminal e ventosa ventral. 5.9. Região anterior do macho e início do canal ginecóforo. 5.10. Detalhe da ventosa. | 17 |
| Figs 5.11-5.12 | <i>S. mansoni</i> . MEV. 5.11. Detalhe da ventosa ventral e início do canal ginecóforo. 5.12. Detalhe do tegumento ventral. | 18 |
| Figs 5.13-5.14 | <i>S. mansoni</i> . MEV. 5.13. Vista total ventral do macho. 5.14. Detalhe dos tubérculos do tegumento dorsal do macho com espinhos. | 19 |
| Figs 5.15-5.16 | <i>S. mansoni</i> . MEV. 5.15. Tubérculo em detalhe com abertura central. 5.16. Detalhe do tubérculo e organela sensorial uniciliada. | 20 |
| Figs 5.17-5.22 | <i>S. mansoni</i> . Microscopia a laser com focal (MLC). 5.17 Camada externa to tegumento. 5.18. Mesma área com fibras longitudinais. 5.19. Área basal dos tubérculos. 5.20. Fibras musculares e tubérculos. 5.21. Projeção das figuras 17 a 20. 5.22. Reconstrução 3D do tegumento dorsal do macho. | 21 |
| Figs 5.23-5.24 | <i>S. mansoni</i> . MET. 5.23. Tubérculo com fibras musculares interrompidas pela passagem de canais citoplasmáticos com vesículas. 5.24. Detalhe do tubérculo. | 22 |
| Figs 5.25-5.27 | <i>S. mansoni</i> . MET. 5.25. Tubérculos com espinhos e vesículas eletrondensas. 5.26. Detalhe de espinhos. 5.27. Expansões do sincício com inserção de espinho e expansões citoplasmáticas. | 24 |
| Figs 5.28-5.30 | <i>S. mansoni</i> . MET. 5.28. Corte longitudinal do tegumento. 5.29. Sincício. 5.30. Detalhe da inserção dos espinhos. | 25 |
| Figs 5.31-5.33 | <i>S. mansoni</i> . Microscopia eletrônica de transmissão. 5.31. Tubérculo em formação. 5.32. Detalhe dos espinhos tegumentares. 5.33. Detalhe do tubérculo. | 26 |
| Figs 5.34-5.37 | <i>S. mansoni</i> . Microscopia eletrônica de transmissão. Diferentes estágios de formação de tubérculos. | 27 |
| Figs 5.38-5.40 | <i>S. mansoni</i> . MET. 5.38. Vesículas eletrondensas próximas aos espinhos. 5.39. MET de região de transição entre tegumento dorsal e ventral. 5.40. Detalhe do bulbo sensorial com expansão ciliar. | 28 |
| Figs 5.41-5.42 | <i>S. mansoni</i> . MET. 5.41. Tegumento com órgão sensorial (*), feixes musculares e canais citoplasmáticos. 5.42. Detalhe de órgão sensorial (*) e vesículas do sincício. | 29 |
| Figs 5.43-5.44 | <i>S. mansoni</i> . MET de órgão sensorial (seta preta) com feixes musculares (m) e membrana basal (seta branca). | 30 |

| | | |
|-----------------------|---|----|
| Figs 5.45-5.46 | <i>S. mansoni</i> . Microscopia eletrônica de transmissão. 5.45. Órgão sensorial no canal ginecóforo. 5.46. Detalhe do órgão sensorial com base reforçada e cílio apical. | 31 |
| Figs 5.47-5.48 | <i>S. mansoni</i> . MEV. 5.47. Abertura do canal ginecóforo. 5.48. Tegumento do canal ginecóforo. | 32 |
| Figs 5.49-5.50 | <i>S. mansoni</i> . MET do tegumento do canal ginecóforo. 5.49. Células tegumentares. 5.50. Detalhe do núcleo, expansões citoplasmáticas e membrana basal. | 33 |
| Figs 5.51-5.52 | <i>S. mansoni</i> . MET do tegumento do canal ginecóforo. 5.51. Canais citoplasmáticos. 5.52. Feixes musculares. | 34 |
| Tabela 1 | Número de ovos por grama de fezes (OPG) nos intervalos de tempo: 0, 12 e 24 horas de montagem das lâminas. | 36 |
| Figs 5.53-5.57 | Ovos de <i>S. mansoni</i> . ML. 5.53. Técnica do SAF observado em uma hora com detalhes do miracídio. 5.54-5.55. Técnica do SAF observado em 24 horas. 5.56-5.57. Técnica do KATO-KATZ. | 37 |
| Fig. 5.58 | Média de ovos por grama de fezes (OPG) nas técnicas de SAF e Kato-Katz em 0, 12 e 24 horas de montagem das lâminas. | 38 |
| Tabela 2 | Número de ovos por grama de fezes (OPG) nos intervalos de 1 e 24 horas após a montagem das lâminas. | 39 |
| Fig. 5.59 | Média de ovos por grama de fezes (OPG) nas técnicas de SAF e Kato-Katz em 1 e 24 horas de montagem das lâminas. | 40 |



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

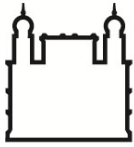
***SCHISTOSOMA MANSONI* (TREMATODA: DIGENEA) SAMBON, 1907: DIAGNÓSTICO ULTRAESTRUTURAL E LABORATORIAL**

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Roberto Carlos Ferreira João

A esquistossomose é uma das parasitoses mais prevalentes no mundo e o *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 é o trematódeo agente da esquistossomose intestinal, endêmica em países da América do Sul, África, Oriente Médio e Caribe. Em Angola, os primeiros dados da esquistossomose foram registrados em 1897 na província do Bengo, mas a prevalência do *S. mansoni* é, no entanto pouco notificada. No âmbito da cooperação internacional Fiocruz (Brasil)-Fesa (Angola) que visa capacitar no Brasil profissionais da área de Saúde de Angola, este trabalho está voltado para estudos sobre a caracterização ultraestrutural e diagnóstico laboratorial do *S. mansoni*. Os objetivos incluíram: estudar a topografia de adultos de *S. mansoni*; caracterizar os tubérculos do tegumento do macho por microscopia eletrônica de varredura, de transmissão e por microscopia a laser confocal; descrever um método alternativo para exame de fezes, baseado no princípio de Kato-Katz, utilizando o fixador SAF e comparar o método Kato-Katz utilizado para o diagnóstico da esquistossomose com o método alternativo. A topografia dos machos evidenciou a presença de tubérculos na superfície dorsal do corpo que em cortes ultrafinos aparecem como evaginações tegumentares que abrem espaço entre as fibras musculares elevando as membranas basal e apical. Entre estas membranas que revestem os tubérculos, há vesículas eletrondensas, eletrólúcidas e corpos alongados. As vesículas formadas na região interna do tegumento, próximo ao núcleo das células são encontradas nos canais citoplasmáticos que chegam à superfície externa do sincício. Os espinhos dos tubérculos aparecem sobre a membrana basal, próximos às vesículas eletrondensas. No tegumento há organelas sensoriais contendo bulbo basal e projeção apical com cílio e corpos basais. O canal ginecóforo apresenta espinhos pequenos, uniformes e organelas sensoriais uniciliadas. A camada entre a membrana basal e a apical é mais homogênea e os espinhos aparecem de forma uniforme no tegumento sem a formação de tubérculos. Utilizando o diagnóstico laboratorial pelo Kato-Katz não foi possível visualizar os ovos no momento da montagem da lâmina (0h), mas a incidência de visualização aumentou em 24h. Na técnica modificada do SAF, os ovos foram identificados imediatamente e a visualização diminuiu ao longo do tempo. Comparando em função do tempo, as médias da análise de ovos por grama de fezes (OPG) das três infecções nas duas técnicas, observou-se que o número de ovos encontrados com a técnica de SAF (0h) foi maior em 7,7% do que com Kato-Katz (24 h). Não houve diferença significativa entre os resultados obtidos com SAF (0h) e Kato-Katz (24 h). O mesmo resultado foi verificado com 12 horas para as duas técnicas. No segundo experimento o OPG pelo SAF (1h) foi 13,1% maior do que Kato-Katz (24h) de leitura. Comparando os resultados obtidos nas duas técnicas com 24 h de leitura, o OPG foi 32,5% maior na técnica de Kato-Katz do que SAF. O método experimental baseado no fixador SAF é eficiente para diagnóstico laboratorial alternativo, simples, rápido, de baixo custo e eficiente para o diagnóstico de esquistossomose mansônica. Este estudo trará novos avanços no diagnóstico desta doença em Angola.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

***SCHISTOSOMA MANSONI* (TREMATODA: DIGENEA) SAMBOM 1907: DIAGNÓSTICO ULTRAESTRUTURAL E LABORATORIAL**

ABSTRACT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Roberto Carlos Ferreira João

Schistosomiasis is one of the most prevalent parasitic diseases in the world and the trematode *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 is the agent of intestinal schistosomiasis, endemic in countries of South America, Africa, Middle East and the Caribbean. In Angola, the infection was first recorded in 1897 in the Bengo province, however the prevalence of *S. mansoni* remains underestimated. In the framework of an international cooperation between Fiocruz (Brazil)-Fesa (Angola), which aims to train health professionals from Angola in Brazil, this work is focused on ultrastructural studies and laboratory diagnosis of *S. mansoni*. The objectives included: to study the topography of adult *S. mansoni*; to characterize the tubercles of the tegument of the male by scanning and transmission electron microscopy and laser confocal microscopy; to describe an alternative method for stool examination, based on the principle of Kato-Katz method, using the SAF fixative, and compare the Kato-Katz method used for the diagnosis of schistosomiasis with the alternative method. The topography of the males showed the presence of tubercles on the dorsal surface of the body that in ultrathin cuts appear like tegumentary evaginations that interweave between the muscle fibers raising the basal and apical membranes. Between these membranes that cover the tubercles, there are electrondense and electronlucid vesicles, and elongated bodies. The vesicles formed in the inner region of the integument near the cell nucleus are found inside the cytoplasmic channels reaching the outer surface of the syncytium. The spines of the tubercles emerge over the basal membrane, near the electrondense vesicles. The integument has sensory organelles containing a basal bulb and apical projection with cilium and basal bodies. The ginecoforous channel presents uniform small spines, and uniciliate sensory organelles. The layer between the basal and apical membrane is more homogeneous with spines appearing evenly, without forming tubercles. The laboratory diagnosis using the Kato-Katz method was not successful to show the eggs at time (0h), but the display increased at 24h after the sampling. The modified technique of the SAF, showed the eggs immediately and display decreased over time. Comparing both methods by time, the mean number of eggs per gram of feces (EPG) by two techniques of the three infections, we found that the number of eggs found with the technique of SAF (0h) was higher by 7.7% than with Kato-Katz (24 h). There was no significant difference between the results obtained with SAF (0h) and Kato-Katz (24 h). The same result was observed for 12 hours with both techniques. In the second experiment, the EPG by SAF (1h) was 13.1% higher than Kato-Katz (24h). Comparing the results of the two techniques with 24 hours of sampling, the EPG was 32.5% higher in the Kato-Katz technique than SAF. The experimental method based on the SAF fixative is an efficient alternative for laboratory diagnosis, being simple, fast, inexpensive and efficient for the diagnosis of schistosomiasis. This study will bring new advances in the diagnosis of this disease in Angola.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais

A esquistossomose é ainda hoje uma das parasitoses mais prevalentes no mundo, endêmica em 76 países com estimativa de 207 milhões de pessoas infectadas, sendo que 85% vivem na África (Engels *et al.*, 2002; Steinmann *et al.*, 2006; WHO, 2010) (Figura 1.1).

O *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 é o trematódeo agente da esquistossomose mansônica ou intestinal, endêmica em 52 países da América do Sul, África, Oriente Médio e Caribe (WHO, 2010; Katz & Peixoto, 2000).

É uma doença parasitária hídrica que acomete as comunidades mais pobres da sociedade, onde não há abastecimento de água potável, o saneamento básico é precário e ainda há falta de informação. Sua distribuição geográfica está condicionada a presença de algumas espécies de moluscos de água doce, do gênero *Biomphalaria*, que são os hospedeiros intermediários de *S. mansoni*.

No Brasil, a estimativa de casos de esquistossomose mansônica em 2000 era de seis milhões de infectados (Katz & Peixoto, 2000). A esquistossomose está entre as poucas doenças parasitárias, cuja distribuição e prevalência, em escala mundial, continuam a aumentar. Diversos são os fatores que levaram a este aumento gradual: (i) mudança do perfil epidemiológico da doença antes restrita à área rural e posteriormente expandida para áreas urbanas e de turismo; (ii) estímulo a migrações inter-regionais e (iii) ocupações desordenadas do espaço urbano utilizando areia de áreas endêmicas, construção de represas e obras de irrigação exigidas pela agricultura moderna (Graunt *et al.*, 1998; Barbosa *et al.*, 2000, 2001). Estes fatores de risco permitiram o maior contato de diferentes populações com os focos de transmissão da doença.

Angola é um país com sérios problemas na área de saúde, pois ainda apresenta muitas debilidades no setor de Saúde Pública, particularmente no diagnóstico, tratamento e na prevenção de doenças com maior impacto na população carente. Os primeiros dados da esquistossomose em Angola foram registrados em 1897 na província do Bengo. Entre 2006-2007, a prevalência da esquistossomose urinária causada pelo *Schistosoma haematobium* em todo o território de Angola era de 66%. A prevalência do *S. mansoni* em Angola é, no entanto pouco notificada (João, 2009). No âmbito da cooperação internacional Fiocruz (Brasil)-Fesa

(Angola) que visa capacitar no Brasil profissionais da área de Saúde de Angola, este trabalho está voltado para estudos sobre a caracterização ultraestrutural e diagnóstico laboratorial do *S. mansoni*.

1.2 Ciclo Evolutivo

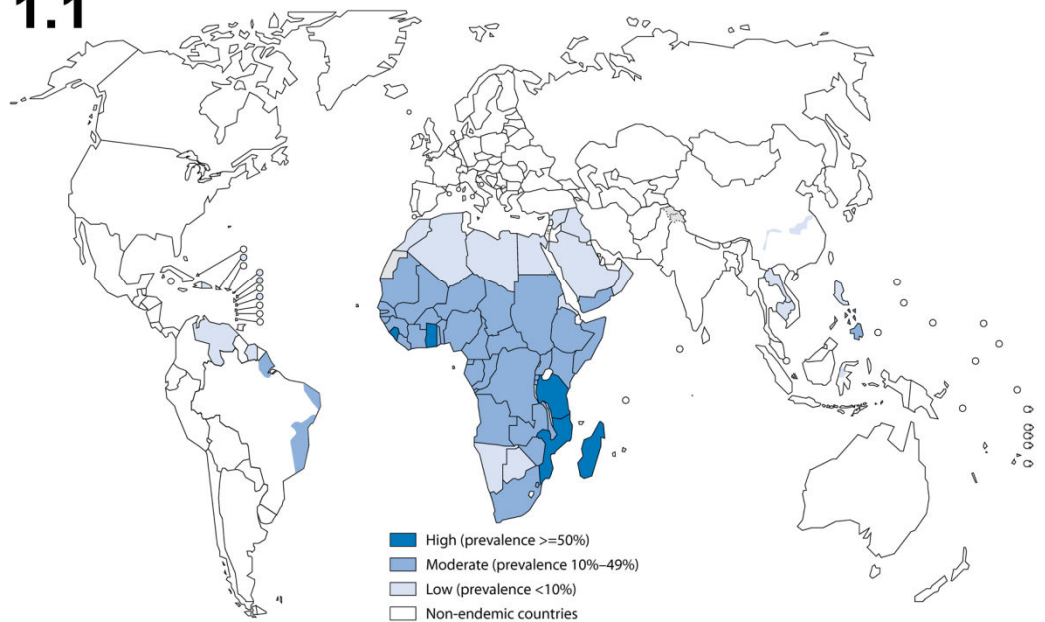
O homem é o hospedeiro definitivo do *S. mansoni* que habita na fase adulta os vasos sanguíneos, preferencialmente nas veias do mesentério e do plexo hemorroidário superior (Rey, 2008). A fêmea raramente abandona o canal ginecóforo sendo levada passivamente durante as migrações do macho, mas consegue alongar-se e insinuar-se nos capilares mais finos, com sua extremidade anterior, perto da qual está o orifício genital.

A postura dos ovos pode ocorrer nos capilares mais próximos à superfície da parede intestinal, onde ovos isolados ou em numerosas fileiras, podem ser observados obstruindo os capilares. A postura de ovos é de um por vez chegando a um total de cerca de 300 ovos por dia. Com auxílio do esporão, os ovos atravessam a parede intestinal e junto com as fezes do homem são depositados diretamente na água, ou são arrastados para dentro da água pelas chuvas. Após a postura os parasitos se deslocam indo invadir outros vasos, onde o fenômeno se repete. Os ovos maduros vivem em média 20 dias, mas no ambiente mantêm-se vivos de 2 a 5 dias na massa fecal sólida e em fezes líquidas apenas um dia, devido ao processo de fermentação e putrefação (Rey, 2008) (Figura 1.2).

A eclosão dos ovos dá-se rapidamente influenciada pela luz, temperatura e oxigênio. Os miracídeos nadam ativamente descrevendo grandes circuitos rotatórios em torno do seu eixo, vivendo em média 10 a 12 horas até encontrar seu hospedeiro intermediário, os moluscos *Biomphalaria glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila*. Após a penetração no molusco hospedeiro intermediário, surgem após 8 dias os esporocistos primários que devido a presença de células germinativas no seu interior transformam-se em esporocistos secundários. Os esporocistos secundários dão origem às cercárias em torno de 3 a 4 semanas (Rey, 2008).

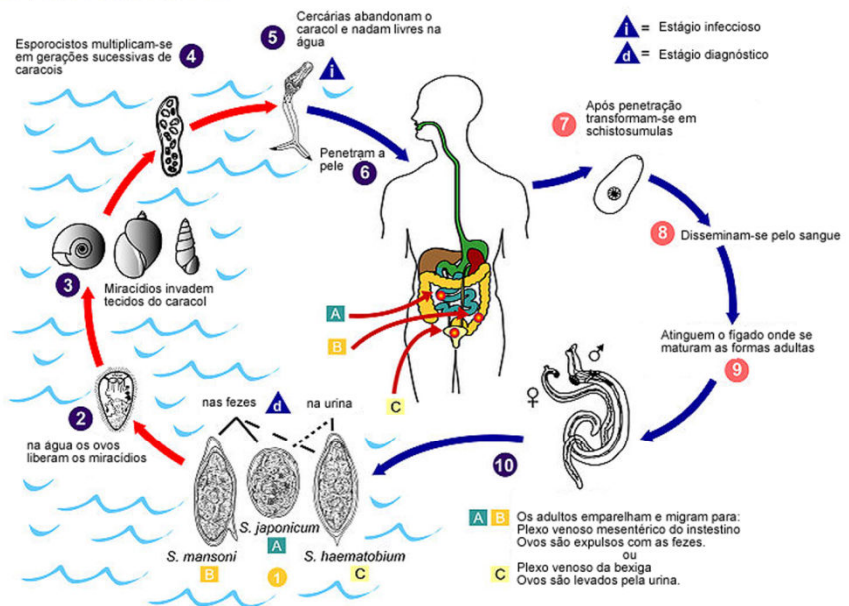
O número de cercárias varia com a espécie do molusco hospedeiro intermediário, sendo muito alto em *Biomphalaria glabrata*, cerca de 1.000 a 3.000 cercárias por dia e mais de 100.000 durante toda a vida do molusco. A presença de cercárias na água é cíclica ao longo do dia pois começam a aparecer cerca das 9 horas da manhã, alcançam sua máxima densidade às 11 horas e diminuem e desaparecem por volta das 16 - 17 horas. As cercárias abandonam o

1.1



1.2

ESQUISTOSSOMOSE



Figuras 1.1 - 1.2 . 1.1.Mapa da distribuição mundial da esquistossome. 1.2 Ciclo da esquistossomose. Fontes:http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_schistosomiasis_2009.png;<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/92/Esquistossomose-2.png>

corpo do molusco e permanecem na água e a penetração através da pele no hospedeiro definitivo deve acontecer entre 3 a 15 min, ao fim dos quais o parasito, se não for destruído pelos mecanismos de defesa do hospedeiro, acaba por penetrar em um vaso cutâneo e é arrastado pela corrente sanguínea em direção ao coração, pulmão e após 8 dias alcança o sistema porta infra-hepático (fígado) transformando-se em adultos (Rey, 2008).

O acompanhamento de infecções experimentais e manutenção do ciclo do *S. mansoni* em laboratório possibilitaram a realização dos diferentes testes diagnósticos laboratoriais desenvolvidos neste trabalho.

1.3 Ultraestrutura

O *Schistosoma mansoni* apesar de ter sido o primeiro Trematoda a ser estudado em 1955 por microscopia eletrônica, continua ainda hoje a ser analisado sob diferentes perspectivas (Hockley, 1973).

Miller *et al.* (1972) estudaram a superfície do tegumento do *S. mansoni* através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostrando os tubérculos do tegumento do macho e os espinhos presentes em grande parte da superfície do corpo mas ausentes no canal ginecóforo. O efeito das drogas anti-helmínticas (oxaminiquine, praziquantel, etc.) sobre a morfologia de adultos de *S. mansoni* tem sido demonstrado com alterações no tegumento como deformações locais com descamação, erosão, perda de espinhos e formação de bolhas (Kohn *et al.*, 1982; Kalapothakis *et al.*, 1988; Shuhua *et al.*, 2000; Riad *et al.*, 2009). Os efeitos da radiação ultravioleta (UV) no tegumento também foram estudados em adultos de *S. mansoni*, a partir de cercárias expostas à radiação, mas nenhuma alteração na topografia foi relatada (Dajem *et al.*, 2007). Recentemente Xavier *et al.* (2010) demonstraram que o tegumento dos parasitos é um importante alvo de estudo porque seu desenvolvimento e função apresentam capacidade de regulação de acordo com o sistema imune da cada hospedeiro.

A microscopia a laser confocal associada às técnicas de fluorescência tem sido também utilizada para caracterizar algumas estruturas morfológicas do *S. mansoni* em diferentes fases do seu ciclo de vida, destacando estudos sobre fibras musculares e os sistemas nervoso, excretor e reprodutor (Johnston *et al.*, 1990; Bogers *et al.*, 1994; Machado-Silva *et*

al., 1998; Cavalcanti *et al.*, 2009; Kussel *et al.*, 2009; Mair *et al.*, 2009; Hall *et al.*, 2010). O estudo dos tubérculos do tegumento do macho, no entanto, ainda necessita ser ampliado.

O estudo do tegumento de adultos de *S. mansoni* por MEV e microscopia eletrônica de transmissão (MET) aliado às técnicas de microscopia a laser confocal trarão informações adicionais principalmente sobre a estrutura dos tubérculos dos machos.

1.4 Diagnóstico laboratorial

Para o diagnóstico laboratorial da esquistossomose mansônica utiliza-se freqüentemente os exames coproparasitológicos. As técnicas mais utilizadas nos serviços de saúde são as de Kato-Katz e Lutz. Além destes, o método de Stoll é utilizado para estimar a carga parasitária, monitorando a cura, após o tratamento quimioterápico (Rey, 2008). A sensibilidade destes métodos é questionada por diferentes autores como Barreto *et al.* (1990), Rabelo (1997) e Engels *et al.* (1997) devido aos seguintes fatores: carga parasitária baixa, infecções unissexuadas, irregularidade de posturas e ausência de ovos no período pré-patente da infecção e após o uso de medicamentos. Para evitar falsos negativos, recomenda-se utilizar três amostras por paciente em intervalos regulares. Mesmo assim, o uso da coproscopia não exclui a adoção criteriosa de exames clínicos e laboratoriais, indicados para subsidiar os estudos epidemiológicos.

A técnica de Kato-Katz amplamente utilizada e recomendada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) apresenta alguns inconvenientes práticos como: alto custo, inexistência de ovos em infecções leves (menos de 10 ovos/g de fezes), clareamento dos ovos tornando difícil a visualização dos miracídios e sua ineficiência de diagnóstico para alguns parasitos como: *Strongyloides stercoralis*, ancilostomídeos e outros, não devendo ser utilizado em inquéritos parasitológicos (Rey, 2008). Neste contexto faz-se necessário buscar novas alternativas de exame de fezes, que sejam simples, rápidos, de baixo custo e eficientes para o diagnóstico de ovos de helmintos.

2. JUSTIFICATIVA

Em Angola, a espécie prevalente nos casos de esquistossomose é o *S. haematobium*, que possui morfologia, ciclo evolutivo e diagnóstico laboratorial bem distintos do *S. mansoni*. No Hospital Central Dr Antonio Agostinho Neto em Lubango, Angola, o diagnóstico é voltado para a esquistossomose vesical, não sendo realizados exames específicos para o *S. mansoni*.

Neste trabalho, foi possível acompanhar todo o ciclo evolutivo do parasito para realizar um diagnóstico morfológico desta espécie pouco referenciada em Angola, utilizando técnicas avançadas de microscopia eletrônica de varredura e análise por microscopia a laser confocal. O estudo morfológico comparativo por microscopia eletrônica de varredura, de transmissão e por microscopia a laser confocal de adultos de *S. mansoni* dará subsídios para o melhor conhecimento da ultraestrutura destes parasitos com especial enfoque no tegumento do macho e seus tubérculos que constituem um alvo para estudos com anti-helmínticos.

O diagnóstico laboratorial pelo método Kato-Katz em si já constitui um aprendizado a ser implantado no Hospital em Lubango visando subsidiar futuros estudos epidemiológicos, mas um teste para diagnóstico laboratorial alternativo mais simples, rápido, de baixo custo e eficiente tanto para o diagnóstico de ovos de helmintos quanto para cistos de protozoários testado neste trabalho, trará novos avanços no diagnóstico da esquistossomose mansônica e parasitoses associadas.

3. OBJETIVOS

Realizar um diagnóstico ultraestrutural e laboratorial do *Schistosoma mansoni*.

Objetivos específicos:

- Estudar a topografia de adultos de *S. mansoni*;
- Caracterizar os tubérculos do tegumento do macho *S. mansoni* por microscopia eletrônica de varredura, de transmissão e por microscopia a laser confocal;
- Descrever o método alternativo para exame de fezes, baseado no princípio de Kato-Katz, utilizando o fixador SAF, específico para protozoários;
- Comparar o método Kato-Katz utilizado para o diagnóstico da esquistossomose com o método alternativo, baseado no princípio de prensão das fezes, utilizando para fixação o SAF.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Obtenção de amostras de ovos e adultos de *S. mansoni*

A cepa BH (Belo Horizonte) de *S. mansoni* é mantida experimentalmente como rotina no Laboratório de Esquistossomose Experimental/IOC, através da infecção em *Biomphalaria glabrata* (linhagem BH) e camundongos “Swiss” fêmeas de 4 a 6 semanas (CEUA L-0063/08, validade 15/09/12). O ciclo biológico é mantido infectando-se os camundongos por via subcutânea com 150 a 160 cercárias/camundongo, obtidas de grupos de 35 a 40 caramujos infectados, segundo metodologia de Peters & Warren (1969).

Neste trabalho foram contados os ovos e avaliados morfológicamente os adultos de *S. mansoni* provenientes de três destes ciclos experimentais.

Em cada ciclo experimental foram utilizados 30 camundongos distribuídos em seis caixas (gaiolas) de cinco indivíduos cada. Amostras de fezes (pool) de duas caixas com cinco camundongos infectados experimentalmente em cada uma foram utilizadas para o diagnóstico laboratorial do *S. mansoni* através de diferentes técnicas de exames de fezes. Foram comparados os resultados da identificação de ovos por grama de fezes (OPG) pelos métodos tradicionais de Kato-Katz, e pelo método experimental baseado no fixador SAF (acetato de sódio, ácido acético e formaldeído). Para cada pool de fezes, foram feitas três réplicas para cada infecção experimental analisada e lidas três lâminas por método. Foram estudadas as cargas parasitárias de três infecções experimentais diferentes.

Os adultos de *S. mansoni* foram obtidos através de perfusão das veias do sistema porta hepático com solução fisiológica 0,8%. Os parasitos foram em seguida fixados de acordo com as metodologias específicas para microscopia de luz, fluorescência ou microscopia eletrônica de varredura e de transmissão.

4.2 Microscopia de Luz

Amostras de *S. mansoni* foram fixadas em álcool a 70% sob ligeira compressão entre lâmina e lamínula. Os espécimes foram corados por 3 minutos no Carmalumem de Meyer, diferenciados no álcool clorídrico 2% e desidratados em série alcoólica de 70%, 80%, 90% e

100% por 10 minutos cada. Diafanizados pelo óleo de cravo, foram montados em Bálsamo do Canadá entre lâmina e lamínula (Humanson, 1972).

4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Os espécimes foram lavados em solução fisiológica 0,8% e posteriormente fixados em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0.1M pH 7.2 contendo 3,5% de sacarose por 2 horas a 4°C. Depois de lavados no mesmo tampão, foram pós-fixados “overnight” em solução de tetróxido de ósmio 1% (OsO₄) em tampão cacodilato 0.1M em condições de escuridão. Em seguida, os espécimes foram desidratados em séries crescentes de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100%), ou etanol, antes do ponto crítico por CO₂ (CPD 030, Balzers). Os espécimes foram colocados em suporte revestido com fita dupla face, metalizados (Balzers) com 60nm de ouro e observados no Microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM 6390 da Plataforma de Microscopia Eletrônica do Instituto Oswaldo Cruz.

4.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Após lavagem em solução fisiológica 0,8% as amostras foram fixadas por 2 h a 4°C em solução contendo glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 4% em tampão cacodilato 0.1 M contendo 3% de sacarose, pH 7. As amostras foram lavadas no mesmo tampão e pós-fixadas “overnight” em tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato 0.1M pH 7.2 em condições de escuridão. As amostras foram lavadas no mesmo tampão e desidratadas à temperatura ambiente em séries crescentes de acetona. A inclusão gradativa em Epon foi feita através de diferentes concentrações de acetona/Epon (6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 e 1:6) por 24h em cada etapa e depois por Epon puro por 24 h e a resina foi polimerizada a 60°C durante 72h. Em seguida foram obtidos os cortes semi-finos e corados pelo Azul de Toluidina a 2%. Os cortes ultrafinos foram coletados em grades de cobre de 300 mesh e contrastados com acetato de uranila por 25 minutos e citrato de chumbo por 5 min. As observações foram feitas no microscópio eletrônico de transmissão JEOL JEM 1011.

4.5 Microscopia a Laser Confocal (MLC)

Para revelação de actina foi utilizada a faloidina conjugada a TRITC. Os parasitos foram previamente fixados por 5h em paraformaldeído 4% (PFA) e lavados 3 x em PBS (tampão fosfato salino), permeabilizados em 0,5% de TRITON X-100 em PBS por 10 min, incubados com faloidina 1:700 conjugada a TRITC (Sigma) e mantidos overnight a 6°C. Após 3 lavagens em PBS e depois em NaCl 0,85%, as amostras foram montadas em lâminas contendo 2,5% de 1,4-diazabicyclo-(2,2,2)-octano-trietilenodiamina (“Antifading”) e 50% de glicerol, pH 7,2 e seladas com esmalte incolor. Os controles das reações foram feitos com omissão da faloidina. A análise por microscopia a laser confocal foi realizada ao microscópio CLSM Axiovert 510, META, Zeiss.

4.6 Diagnóstico laboratorial

4.6.1 Método de Kato-Katz

Estes exames foram realizados utilizando-se o kit comercial da Helm-Test Labmaster Ind. Com. de Produtos Laboratoriais Ltda, Belo Horizonte. Segundo as instruções do fabricante, uma pequena amostra de fezes foi passada por uma tela com malha definida até preencher o orifício de 6 mm de um molde colocado sobre a lâmina, a fim de obter 43 mg de fezes. Após a retirada do molde, as fezes na lâmina foram cobertas com papel celofane embebido em verde malaquita, com leve pressão para espalhar. O número de ovos presentes foi contado após a realização das lâminas. A quantidade de ovos de *S. mansoni* encontrada foi multiplicada pela constante 24 obtendo-se o número aproximado de ovos por grama de fezes. A carga parasitária foi considerada **baixa** quando havia menos de 100 ovos por grama; **média** entre 101 e 500 ovos e **alta** acima de 500 ovos por grama de fezes (Coura, 2008). De acordo com as instruções do fabricante, recomenda-se fazer a leitura da lâmina no mínimo 4 horas depois da montagem.

4.6.2. Exames de fezes com técnica experimental baseada no fixador SAF

Foram coletadas as fezes de camundongos experimentalmente infectados com *S. mansoni* e processadas utilizando-se a tela e o molde descritos para o método Kato Katz, mas sem a aplicação do papel celofane com verde malaquita. Após a retirada do molde, foram

aplicadas sobre a amostra três gotas (100µl) de SAF (1,5 gramas de Acetato de sódio, 2,9 ml de Ácido acético, 4,9 ml de formol 40% e 92,5 ml de água destilada) segundo fórmula de Junod (1972). O número de ovos presentes foi contado após a montagem das lâminas. A quantidade de ovos de *S. mansoni* encontrada foi multiplicada pela constante 24, obtendo-se o número aproximado de ovos por grama de fezes.

4.6.3 OPG comparativo de duas técnicas coproparasitológicas em infecções experimentais diferentes

Foi analisado o OPG de seis infecções experimentais diferentes de *S. mansoni*, utilizando-se as duas técnicas de diagnóstico descritas nos itens anteriores. Numa primeira etapa foram contados os ovos de três lâminas por técnica, em três infecções diferentes, com 1 réplica para cada infecção. Estes ovos foram contados em tempos diferentes 0h (no momento de montagem da lâmina), 12 horas e 24 horas, a fim de verificar a eficácia da técnica em relação ao tempo de montagem das lâminas.

Em outro experimento foi observado o OPG de três lâminas por cada técnica, em outras três infecções experimentais, com 2 réplicas por infecção. Neste experimento foram contados os ovos em 1 hora e 24 horas, a fim de simular a possível utilização das diferentes técnicas no diagnóstico em campo de *S. mansoni*.

4.6.4 Tratamento Estatístico

Foram comparados os resultados dos dois métodos de diagnóstico laboratorial do *S. mansoni* quanto à sensibilidade, rapidez de realização e clareza na visualização do material nos dois experimentos por tempo de observação: 0, 12 e 24h e 1 e 24h, respectivamente. O método estatístico utilizado foi o GRAPHPAD, V.3.02, Prism inc (para estudos quantitativos), retirado do SOFTWOR. A avaliação estatística foi feita na condição de 95% de validade e apenas 5% de erro. Como os dados não apresentavam distribuição normal, foi utilizado o teste não paramétrico. Para a comparação dos grupos foi realizada o teste de Kruskal-Wallis.

5. RESULTADOS

Filo Platyhelminthes (Gegenbauer, 1859)

Classe Trematoda Rudolphi, 1808

Subclasse Digenea Carus, 1863

Ordem Strigeiformes La Rue, 1926

Família Schistosomatidae Stiles & Hassal, 1898

Gênero *Schistosoma* Weiland, 1858

Espécie *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907

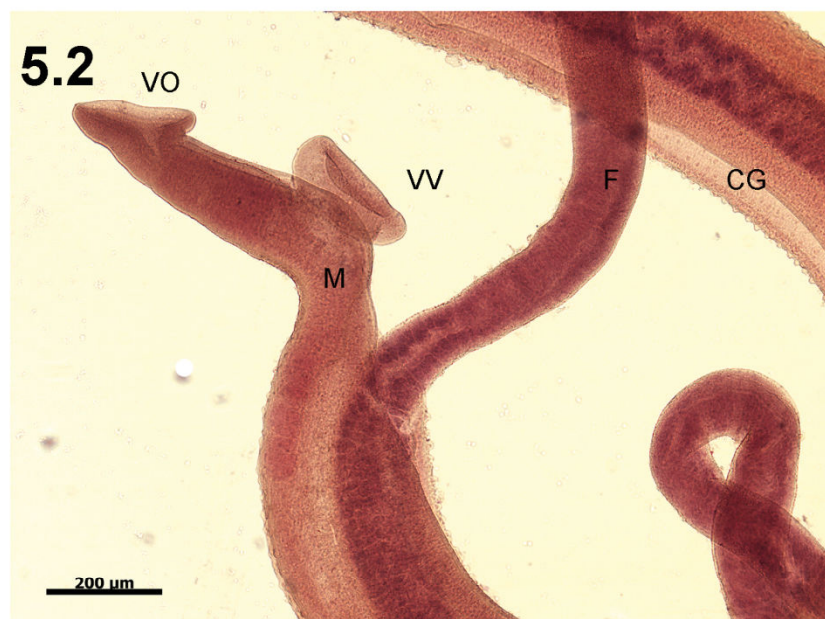
Os machos e fêmeas de *S. mansoni* parasitam o sistema porta-hepático de mamíferos e apresentam acentuado dimorfismo sexual. Na microscopia de luz é possível diferenciar as fêmeas pois apresentam um corpo mais fino e longo que os machos, com tegumento liso e ventosas oral e ventral (acetábulo) reduzidas. Os machos têm um canal ginecóforo onde as fêmeas são comumente encontradas; apresentam numerosos tubérculos na região dorsal do corpo e tem as ventosas oral e ventral bem definidas (Figuras 5.1 e 5.2)

5.1 Diagnóstico ultraestrutural

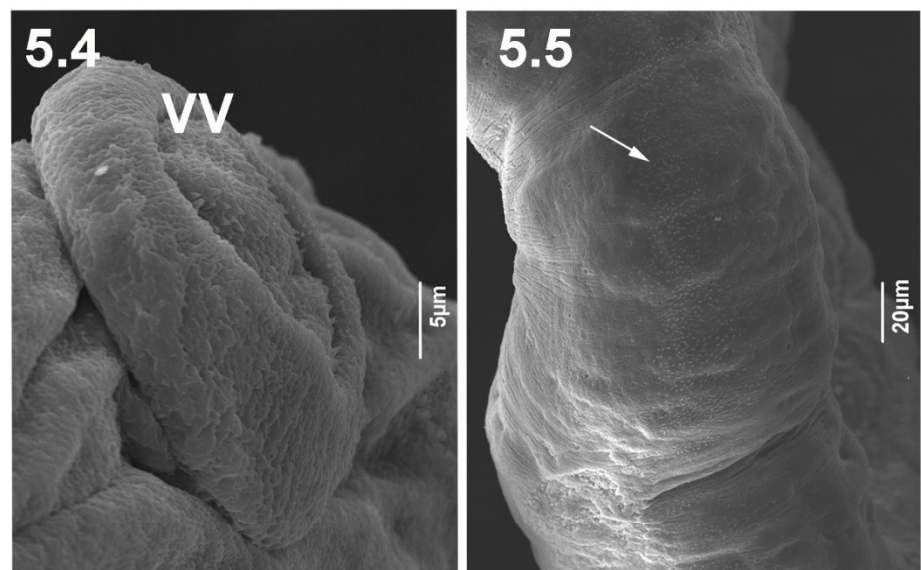
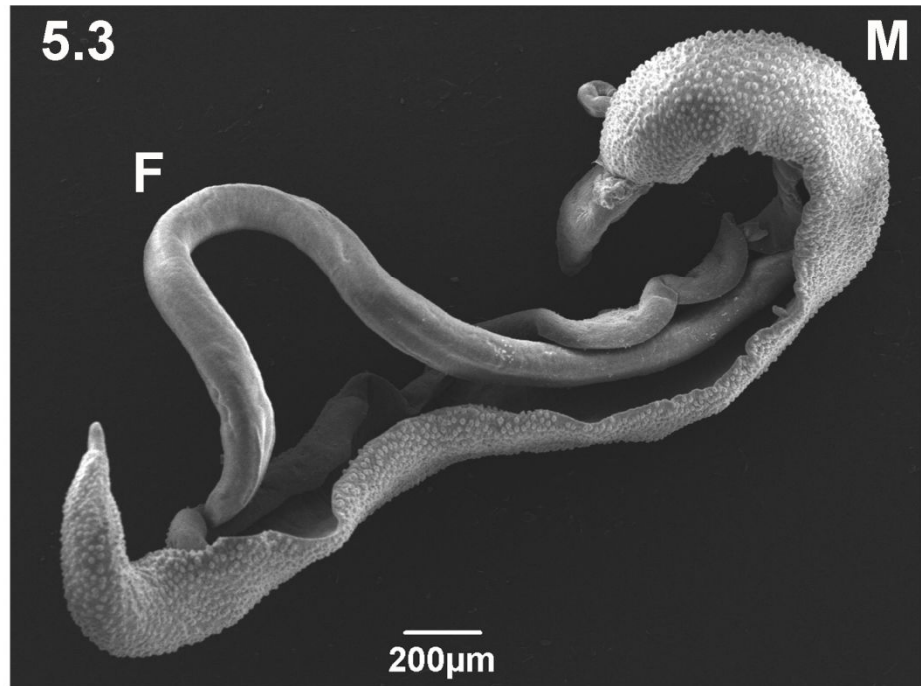
Através da microscopia eletrônica de varredura foi possível evidenciar a fêmea parcialmente deitada no canal ginecóforo do macho (Figura 5.3). A fêmea tem corpo filiforme e alongado com tegumento liso enquanto o macho apresenta tegumento dorsal característico revestido por tubérculos (Figuras 5.3, 5.6, 5.7).

As ventosas na região anterior da fêmea são muito reduzidas sendo que a ventosa ventral tem contorno melhor definido (Figura 5.4). À microscopia eletrônica de varredura, o tegumento das fêmeas se mostrou liso no tocante a tubérculos, no entanto numerosas organelas sensoriais e pequenos espinhos foram observados distribuídos ao longo da região mediana dorsal (Figura 5.5).

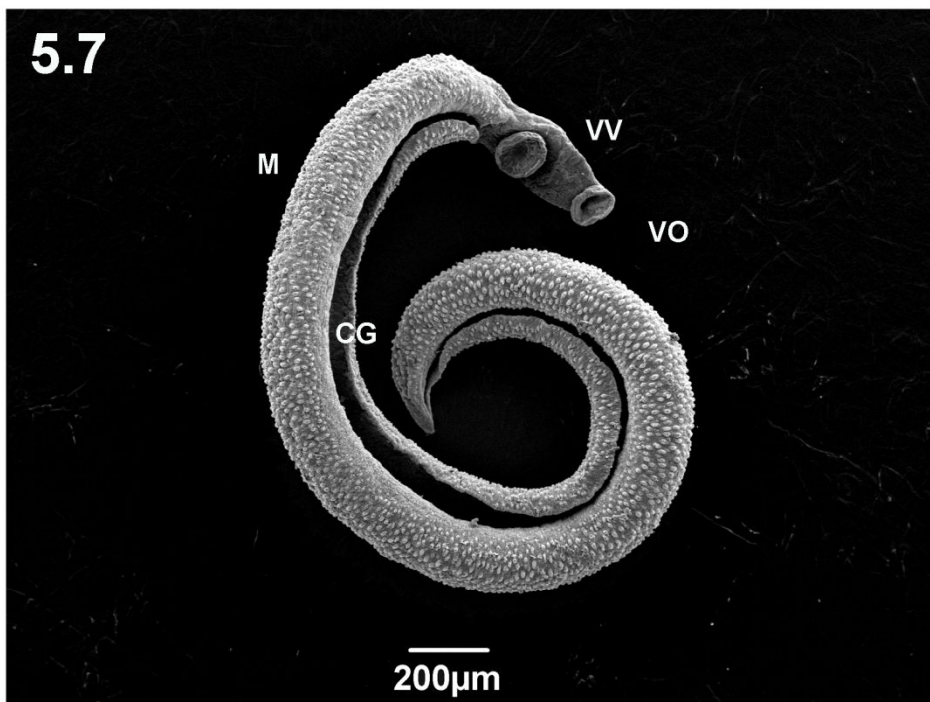
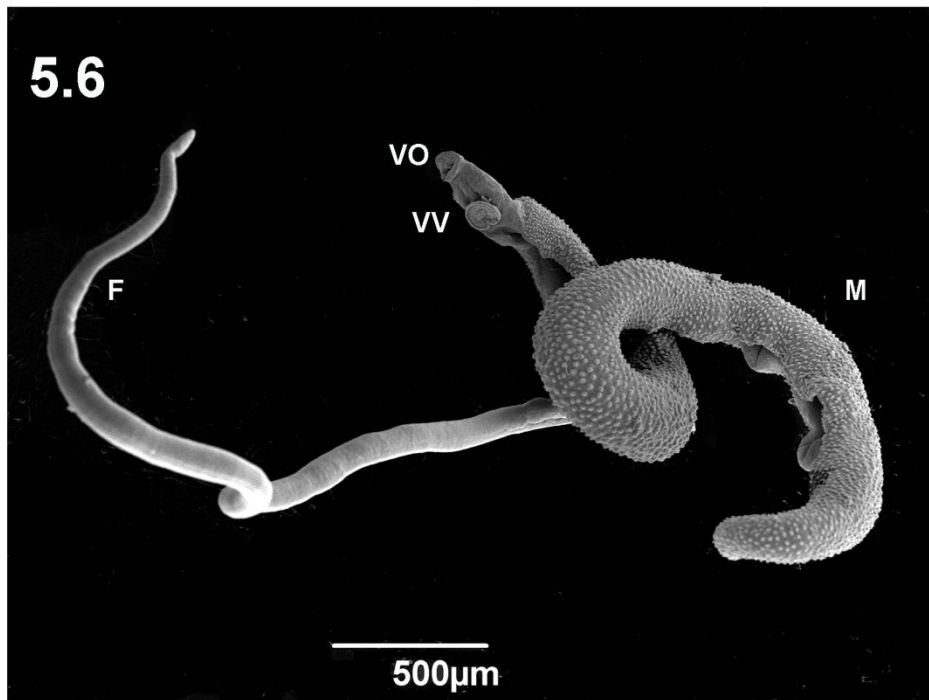
Nos machos, o corpo achatado dorsoventralmente dobra-se na região ventral formando o canal ginecóforo, local onde a fêmea é comumente encontrada (Figuras 5.6 e 5.7). Inúmeros tubérculos revestem o tegumento dorsal dos machos (Figuras 5.6 e 5.7).



Figuras 5.1-5.2. *Schistosoma mansoni*. ML. 5.1. Fêmea (F) parcialmente deitada no canal ginecóforo do macho (M). 5.2. Região anterior do macho com ventosas oral (VO) e ventral (VV) e fêmea (F) saindo do canal ginecóforo (CG).



Figuras 5.3-5.5. Microscopia eletrônica de varredura. 5.3. Fêmea (F) parcialmente deitada no canal ginecóforo do macho (M). 5.4. Ventosa ventral (VV) da fêmea, vista lateral. 5.5. Região dorsal da fêmea com espinhos (seta).



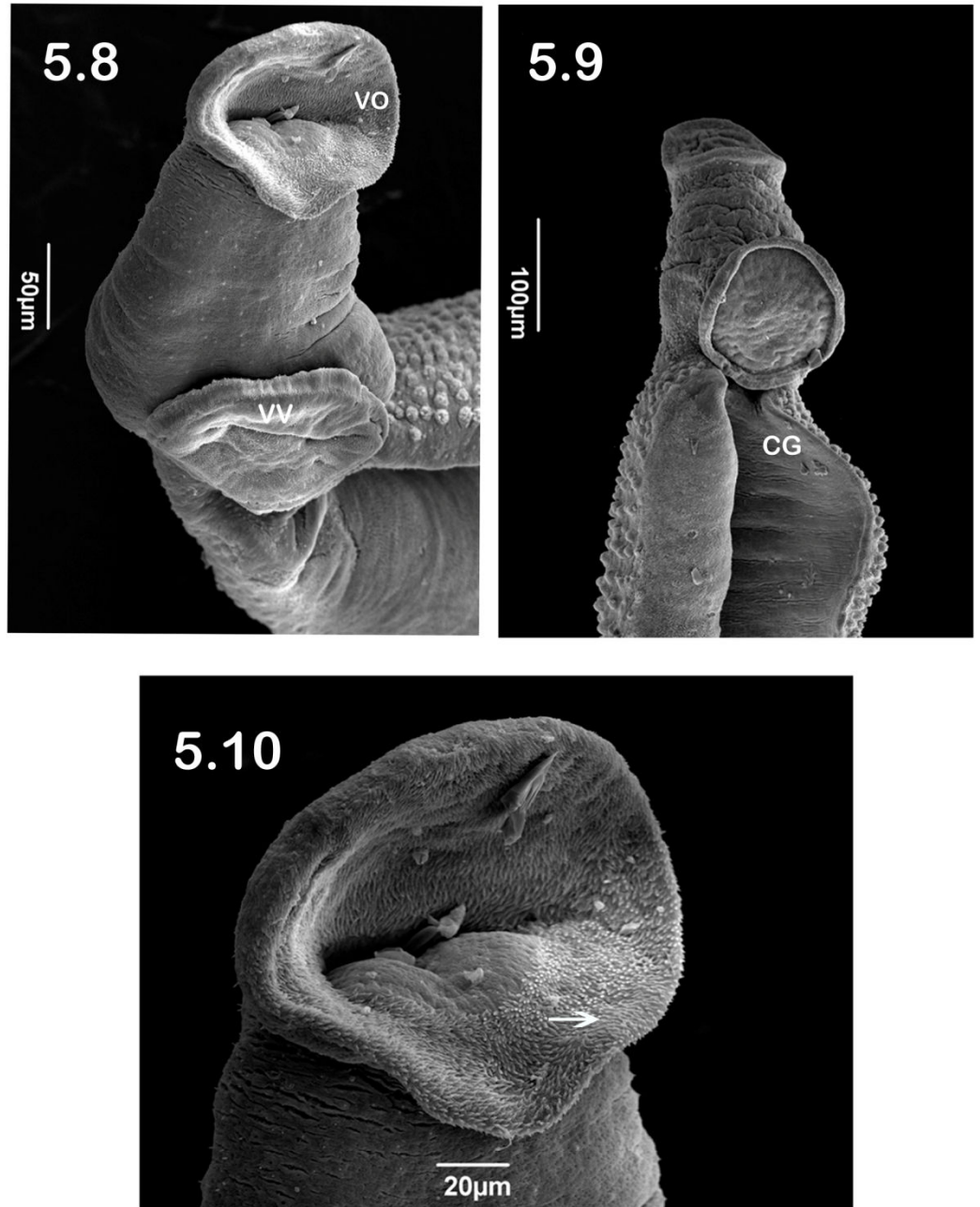
Figuras 5.6-5.7. MEV. 5.6. Casal com fêmea (F) de corpo fino e macho (M) com tegumento rugoso evidenciando as ventosas oral (VO) e ventral (VV). 5.7. Macho (M) com ventosa oral (VO), ventosa ventral (VV) e canal ginecóforo (CG).

A região anterior dos machos é mais estreita do que o resto do corpo, com ventosa oral subterminal e ventosa ventral próxima ao início do canal ginecóforo (Figuras 5.7-5.9). A ventosa oral é revestida internamente de pequenos espinhos e o orifício bucal está situado no interior da ventosa oral (Figuras 5.8 e 5.10). A ventosa ventral em forma de disco, também é revestida de espinhos; na borda reforçada é possível observar a diferença do revestimento externo e interno com um círculo de espinhos maiores (Figuras 5.11, 5.12). O tegumento na região entre as ventosas não tem espinhos ou tubérculos, mas apresenta várias papilas sensoriais (Figura 5.12).

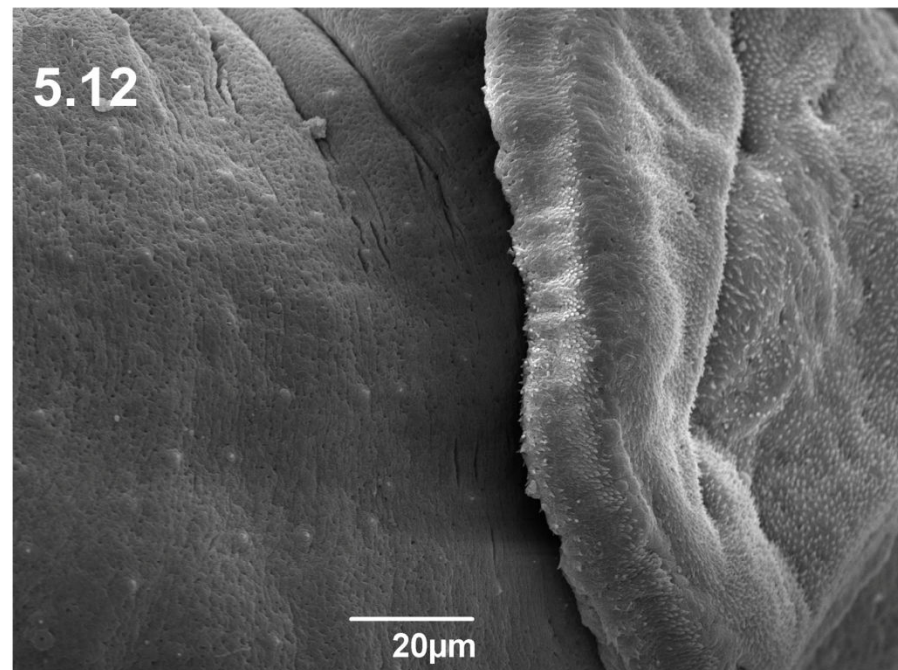
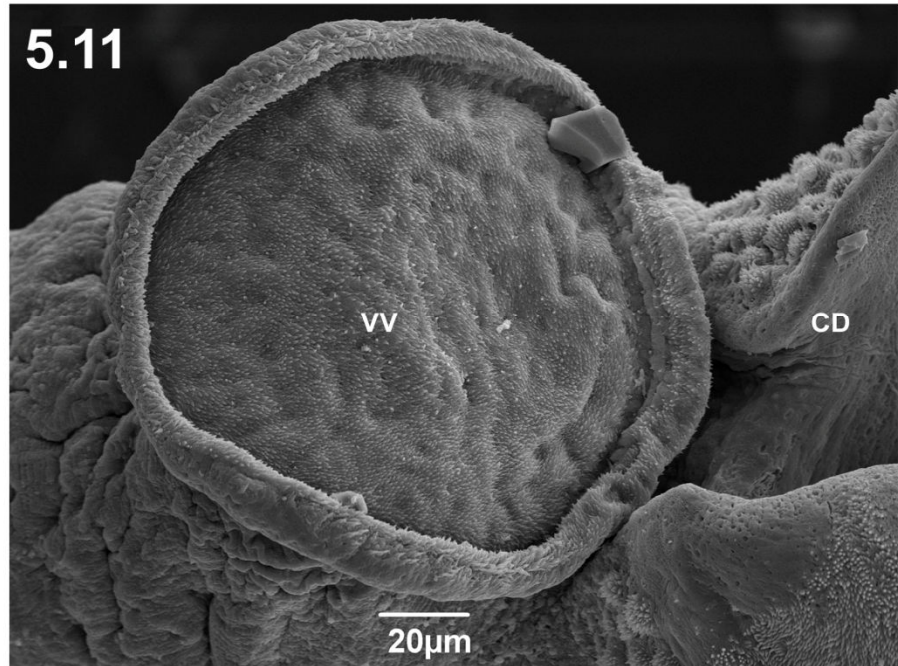
O tegumento do macho é um diferencial para o diagnóstico ultraestrutural da espécie devido às características do revestimento do canal ginecóforo e da forma e distribuição dos tubérculos no tegumento. Os tubérculos dorsais começam a aparecer na altura do início do canal ginecóforo e logo abaixo do acetábulo e ocorrem até a região posterior do corpo (Figura 5.13). O número e o tamanho dos tubérculos diminuem em direção à região posterior e nas laterais do corpo.

Os tubérculos são projeções tegumentares com numerosos espinhos apicais, que podem apresentar ou não orifícios centrais. No tegumento, organelas sensoriais ocorrem entre os tubérculos (Figuras 5.14-5.16). O estudo do tegumento dos machos com tubérculos através da microscopia a laser confocal após marcação com falodina, demonstrou que as fibras musculares circulares ocorrem na superfície mais externa do tegumento, ficando as fibras longitudinais na camada inferior. Os tubérculos tegumentares despontam entre os espaços das fibras musculares (Figuras 5.17-5.21). A distribuição dos tubérculos é irregular, estando dispostos isoladamente ou em pares (Figuras 5.17, 5.18, 5.21, 5.22). Eles emergem por entre as fibras musculares circulares como estruturas arredondas cobertas por espinhos. Em uma projeção em 3D foi possível observar a trama de fibras com os tubérculos de diferentes tamanhos despontando do tegumento (Figura 5.22).

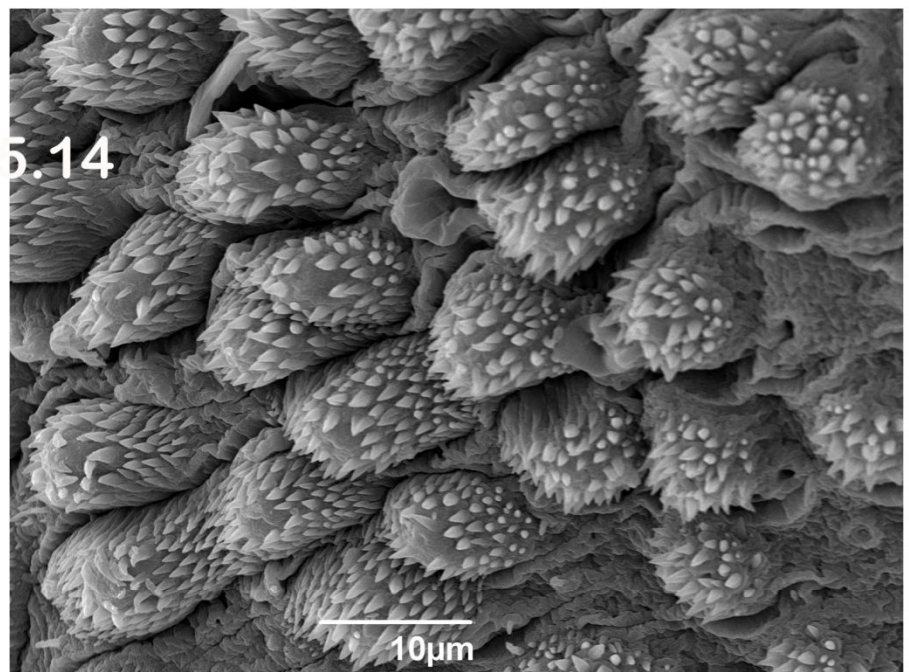
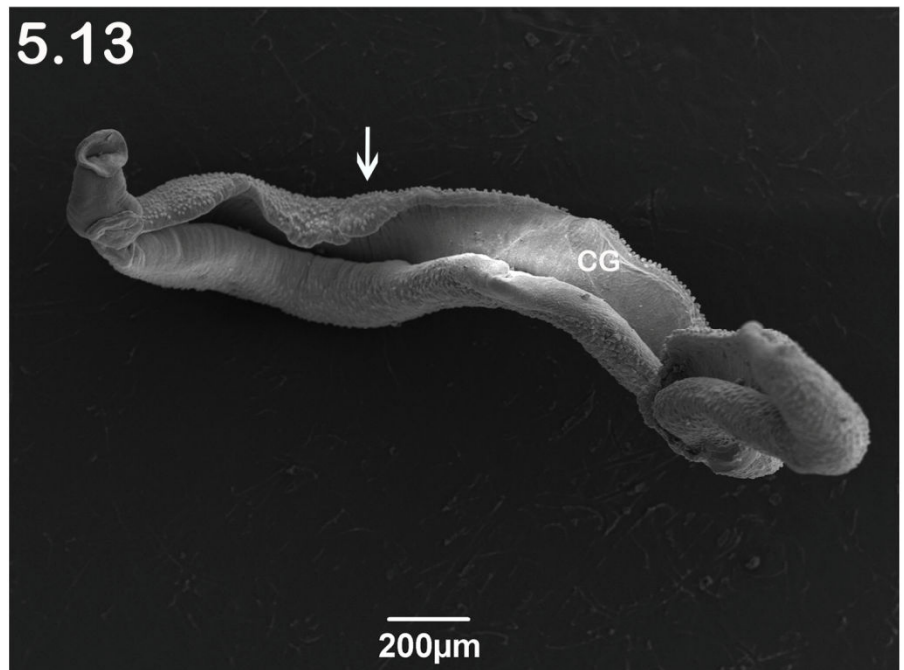
Através da microscopia eletrônica de transmissão, os tubérculos aparecem como expansões ou evaginações tegumentares que abrem espaço entre as fibras musculares empurrando e/ou elevando as membranas basal e apical (plasmática ou externa) (Figura 5.23). A membrana plasmática não se apresenta uniforme; observaram-se ondulações ou depressões ao longo de toda sua superfície do tegumento externo. No interior dos tubérculos observam-se expansões citoplasmáticas formando canais por onde passam as vesículas (Figura 5.24).



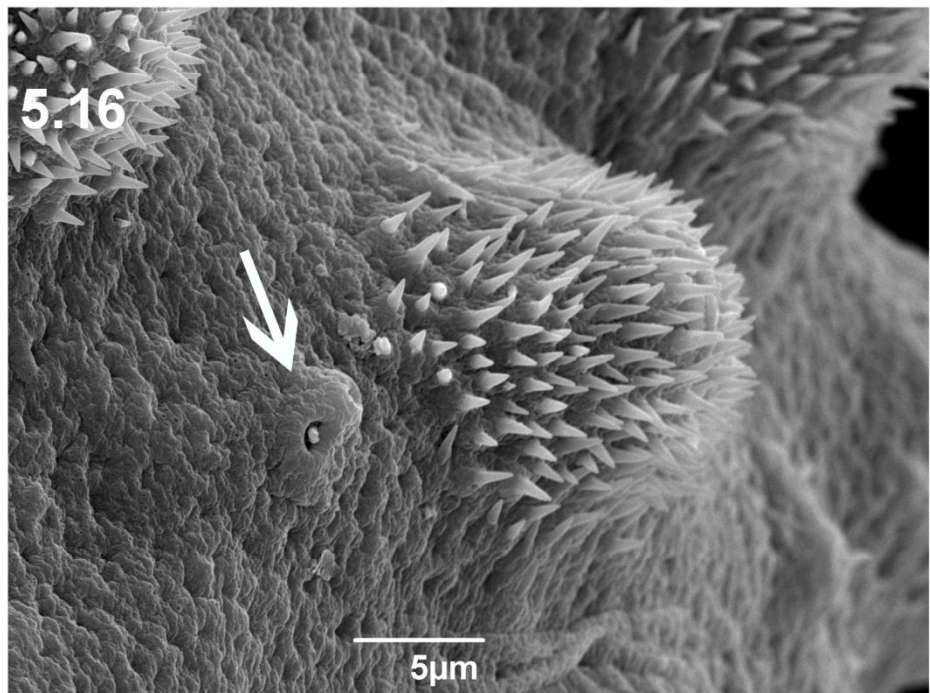
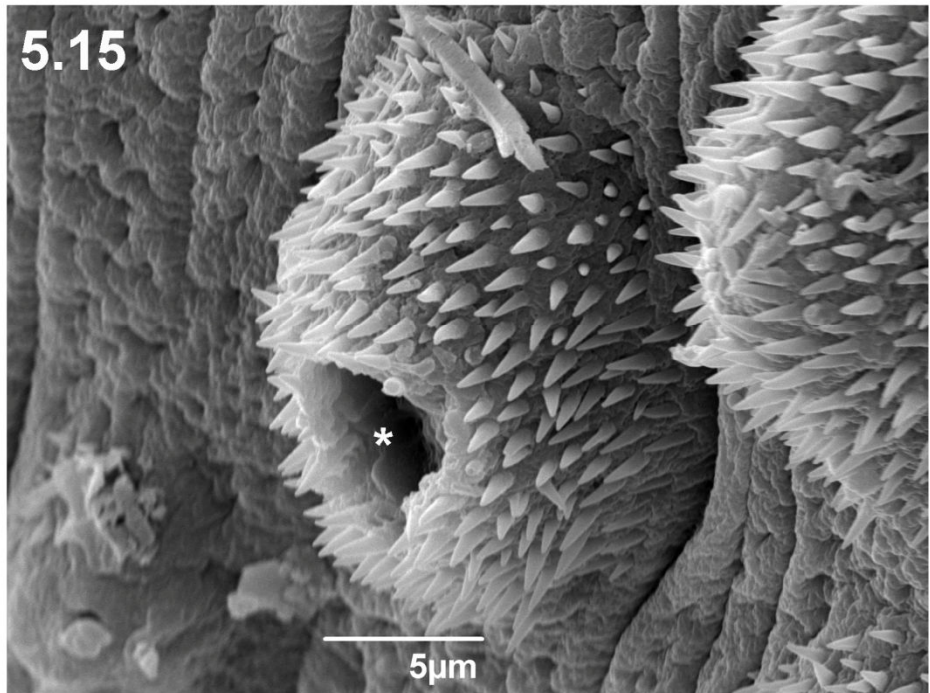
Figuras 5.8-5.10. *Schistosoma mansoni*. MEV. Região anterior do macho com ventosa oral subterminal (VO) e ventosa ventral (VV). 9. Vista ventrolateral da região anterior do macho e início do canal ginecóforo (CG). 10. Detalhe da ventosa oral com projeções tegumentares (seta).



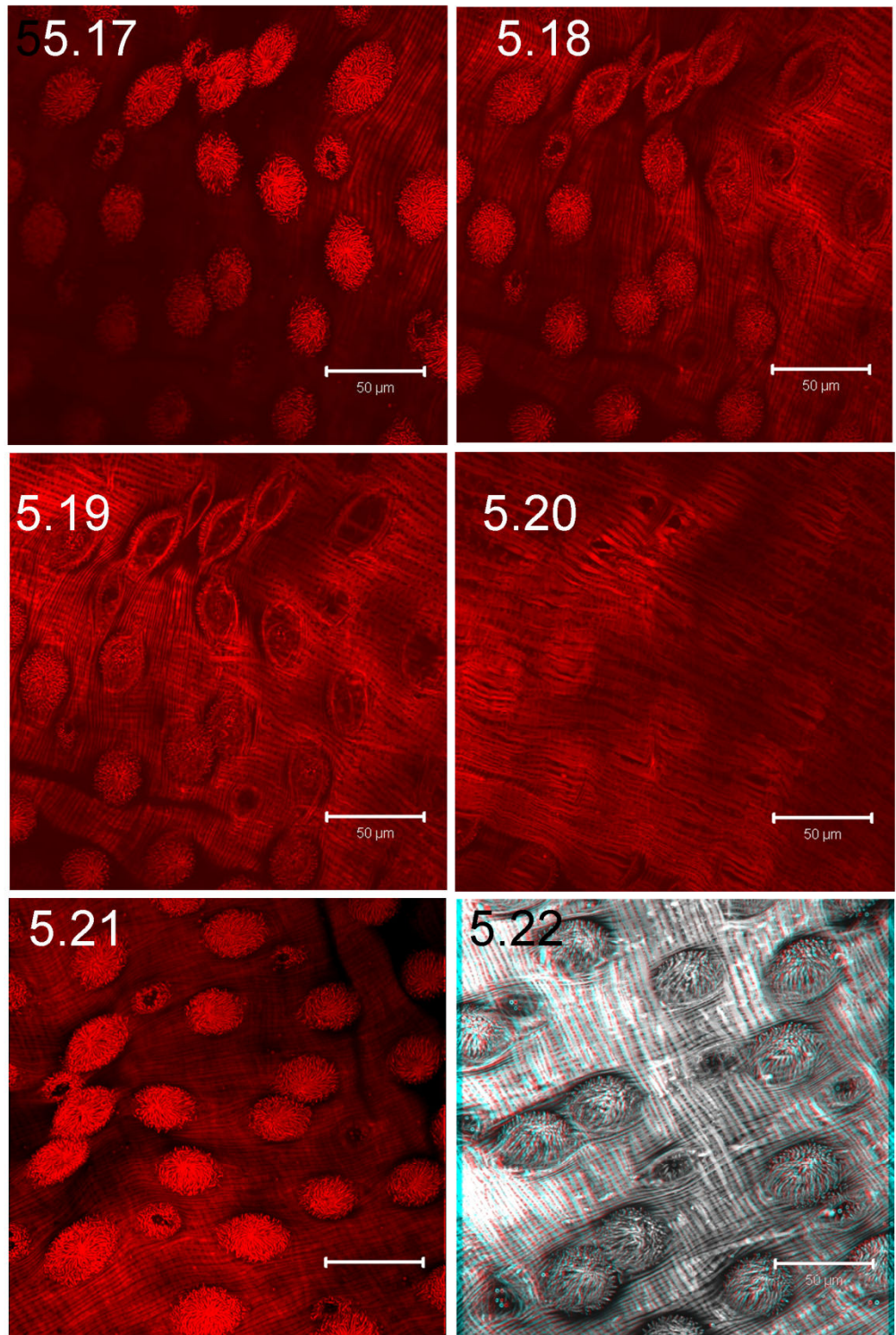
Figuras 5.11-5.12. *Schistosoma mansoni*. MEV. 5.11. Detalhe da ventosa ventral (VV) com borda espessa e início do canal ginecóforo (CG). 5.12. Detalhe do tegumento ventral e borda anterior da ventosa ventral.



Figuras 5.13-5.14. *Schistosoma mansoni*. MEV. 5.13. Vista total ventral do macho com canal ginecóforo (CG) aberto e borda dorsolateral com tubérculos (seta). 5.14. Detalhe dos tubérculos do tegumento dorsal do macho revestido com espinhos.

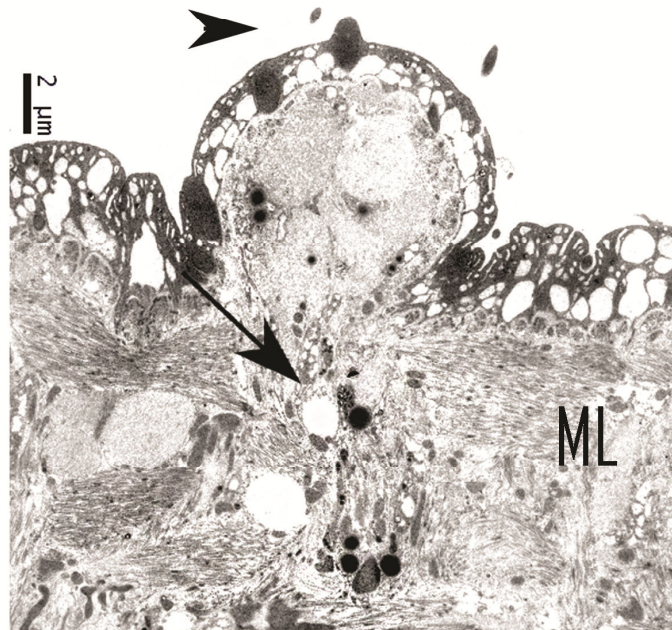


Figuras 5.15-5.16. *Schistosoma mansoni*. Mev. 5.15. Tubérculo em detalhe com abertura central (*). 16. Detalhe do tubérculo e organela sensorial (seta).

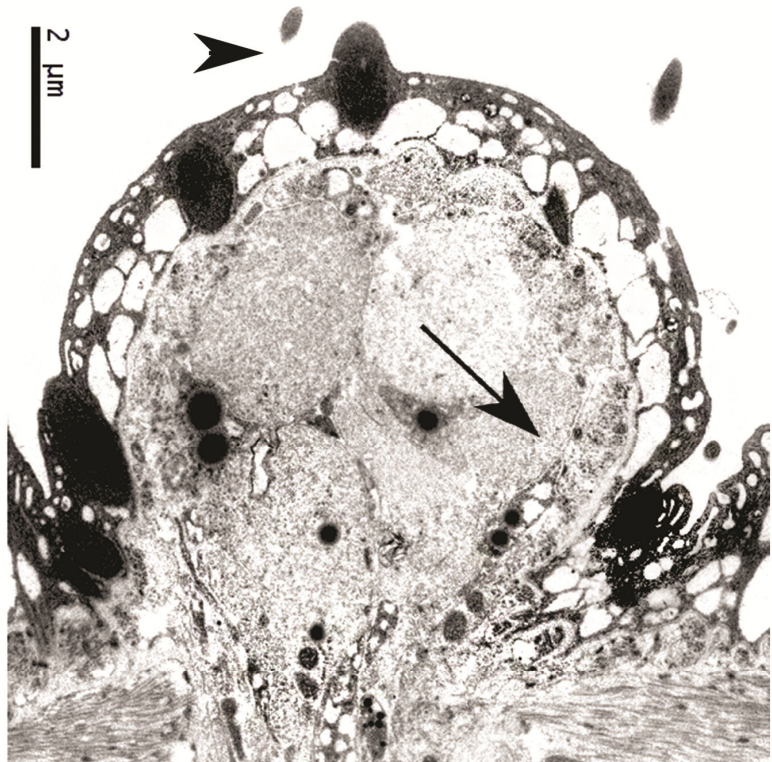


Figuras 17-22. *Schistosoma mansoni*. Microscopia a laser com focal. 17. Vista da camada externa to tegumento com tubérculos e organelas sensoriais entre fibras musculares circulares. 18. Mesma área com foco mais abaixo mostrando rede de fibras longitudinais. 19. Área basal dos tubérculos. 20. Fibras musculares longitudinais abaixo dos tubérculos. 21. Projeção das figuras 17 a 20. 22. Reconstrução 3D do tegumento dorsal do macho.

5. 23



5.24



Figuras 5.23-5.24. *Schistosoma mansoni*. MET. 5.23. Tubérculo com fibras musculares interrompidas pela passagem de canais citoplasmáticos com vesículas. 5.24. Detalhe do tubérculo com expansões citoplasmáticas no seu interior. ML = feixe muscular longitudinal, seta = expansões citoplasmáticas.

Entre as membranas, basal e plasmática que revestem os tubérculos, foi observada grande quantidade de vesículas eletrondensas, eletrólucidas e corpos alongados rodeando quase toda superfície do tegumento. Estas vesículas formadas na região interna do tegumento, próximas aos núcleos das células que ficam protegidos no interior do sincício, são encontradas nos canais citoplasmáticos e chegam à superfície externa se abrindo para expelir sua secreção (Figuras 5.25-5.29, 5.51-5.52).

Os espinhos dos tubérculos aparecem sobre a membrana basal (Figura 5.30). Os tubérculos podem apresentar tamanhos diferentes quando examinados pela microscopia eletrônica de transmissão e os espinhos aparecem próximos às vesículas eletrondensas (Figuras 5.31-5.38). Os diferentes tamanhos dos tubérculos estão associados com o crescimento contínuo de novos tubérculos (Figura 5.34-5.37).

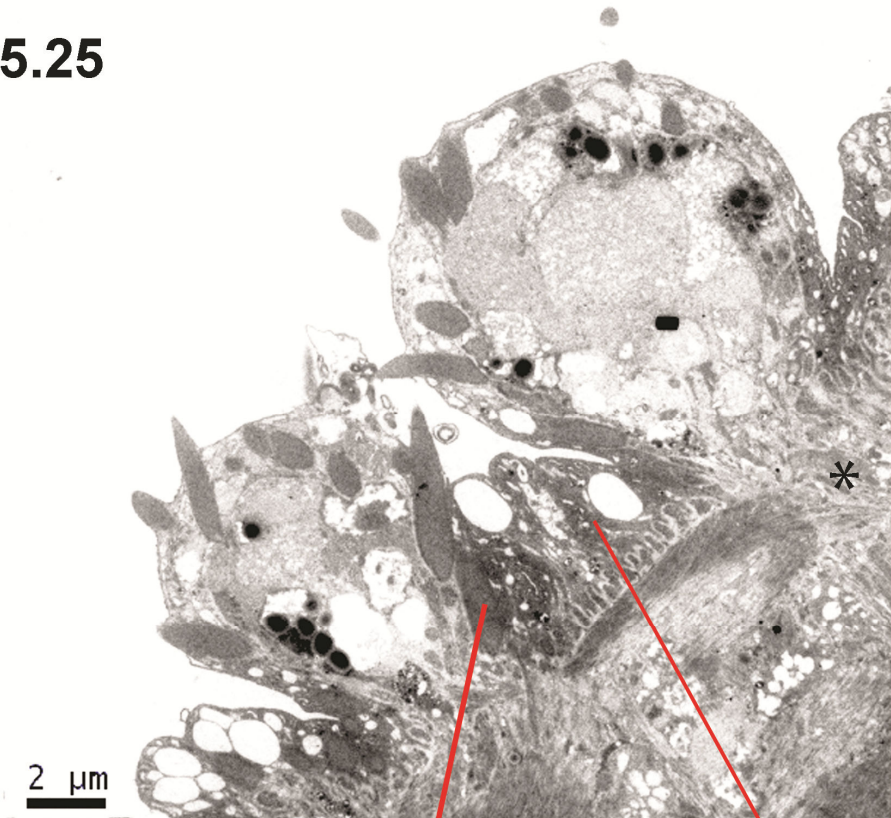
No tegumento foram observadas organelas sensoriais contendo um bulbo basal (Figuras 39-42). Na projeção apical observa-se um cílio e corpos basais (Figuras 5.43-5.46).

A região interna do canal ginecóforo tem tegumento diferenciado, sem a presença de tubérculos. As imagens por MEV mostraram um revestimento interno com espinhos pequenos e uniformes além de organelas sensoriais uniciliadas (Figuras 5.47-5.48). Na microscopia eletrônica de transmissão foi possível observar o sincício com vários núcleos e expansões citoplasmáticas por onde passam numerosas vesículas que são transportadas para o meio externo (Figuras 5.49, 5.52). A camada entre a membrana basal e a apical é mais homogênea e os espinhos aparecem de forma uniforme no tegumento externo, sem a formação de tubérculos (Figuras 5.49-5.52).

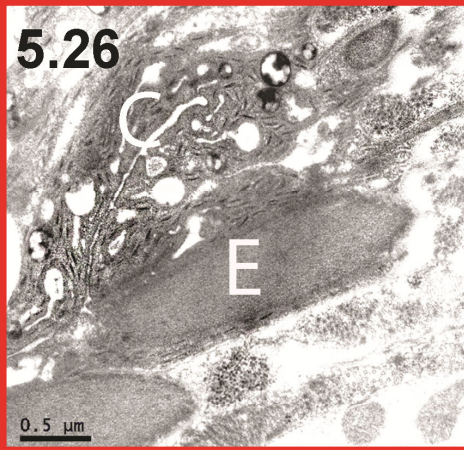
5.2 Diagnóstico laboratorial

A Tabela 1 demonstra os dados relativos ao número de ovos por grama de fezes encontrado nas três lâminas realizadas por cada técnica, nos diferentes intervalos de tempo. Não foi possível visualizar os ovos no momento da montagem da lâmina (zero hora), utilizando a técnica de Kato-Katz. Ao contrário, o número de ovos encontrados na técnica de SAF foi alto no primeiro momento, diminuindo ao longo do tempo, enquanto na técnica de Kato-Katz a visualização dos ovos aumentou em função do tempo. Comparando a qualidade da visualização dos ovos, a técnica do SAF (0h) permite uma visualização nítida das membranas do ovo com detalhes do miracídio (Figura 5.53) e mesmo após 24h, ainda é

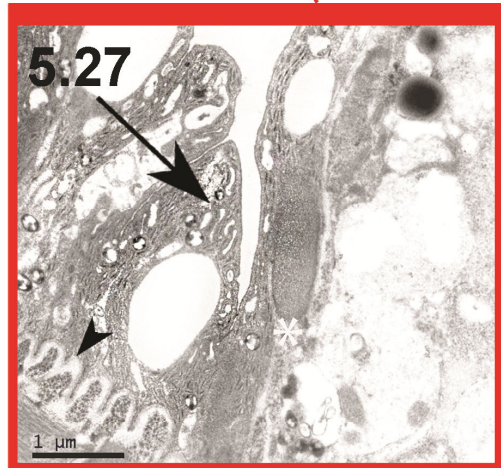
5.25



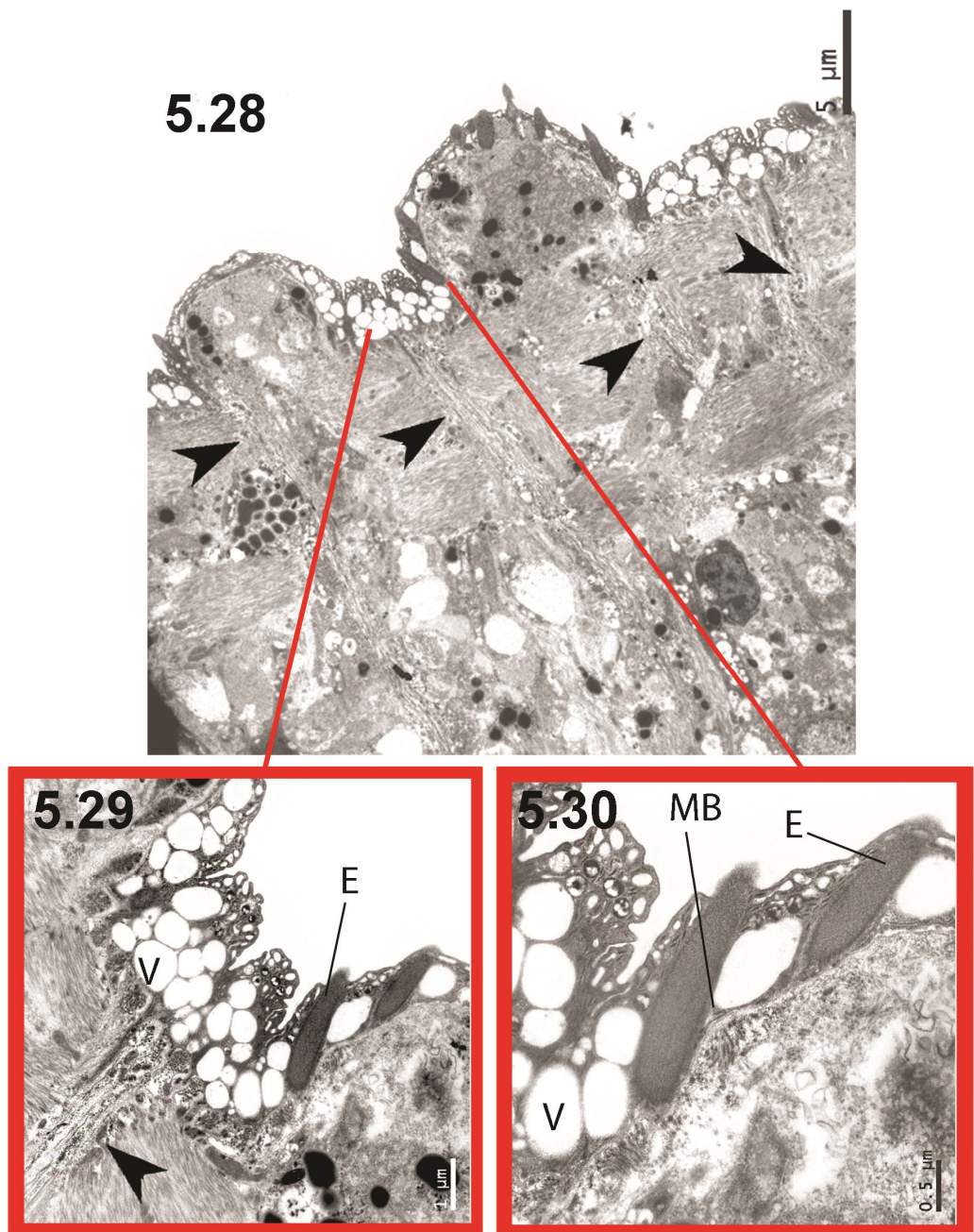
5.26



5.27

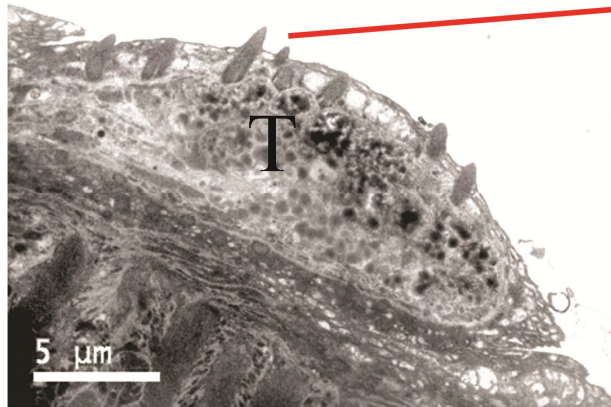


Figuras 5.25-5.27. *Schistosoma mansoni*. MET. 5.25. Tubérculos com espinhos e vesículas eletrondensas entremeados por sincício com vesículas translúcidas. 5.26. Detalhe de espinhos com intensa rede citoplasmática formando canais. C = canais citoplasmáticos, E = espinho. 5.27. Expansões do sincício com inserção de espinho (*), expansões citoplasmáticas (seta) e membrana basal (cabeça de seta).

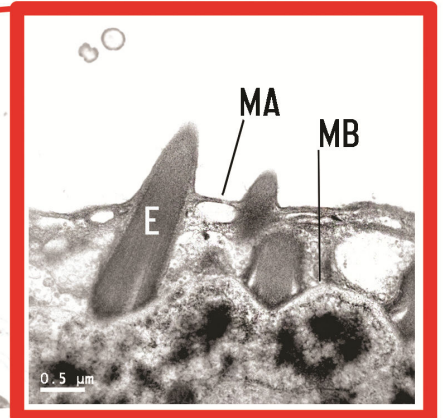


Figuras 5.28-5.30. *Schistosoma mansoni*. MET. 5.28. Corte longitudinal do tegumento com células tegumentares com núcleo interno e canais citoplasmáticos (cabeça de seta). 5.29. Sincício com detalhe dos canais citoplasmáticos (cabeça de seta), vesículas eletrólúcidas (V) e espinhos (E). 5.30. Detalhe da inserção dos espinhos (E) com membrana basal (MB) e vesículas sinciciais.

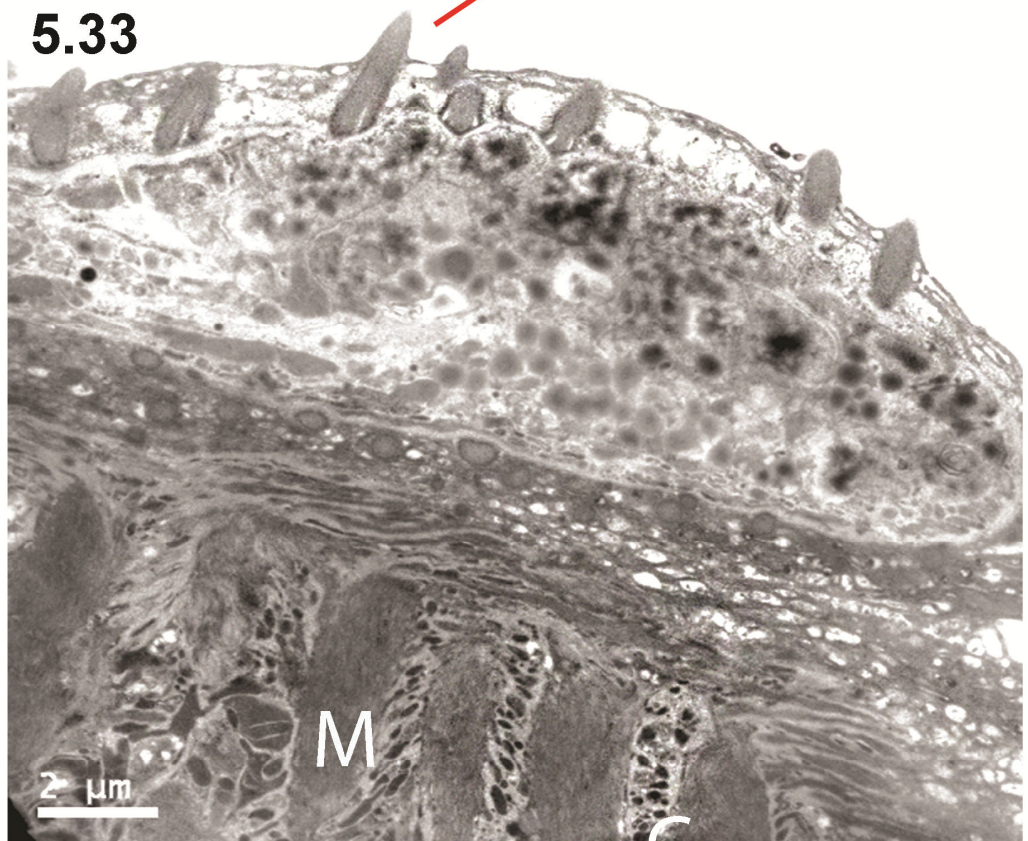
5.31



5.32

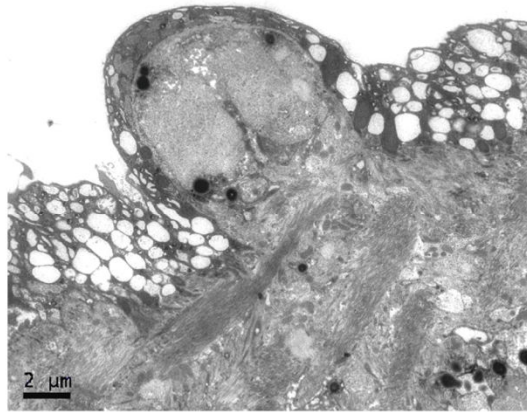


5.33

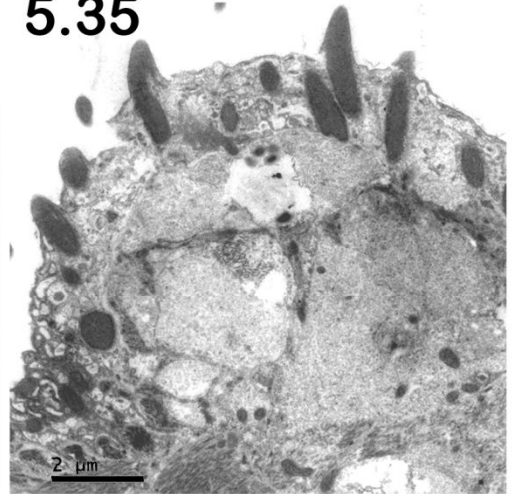


Figuras 5.31-5.33. *Schistosoma mansoni*. MET. 5.31. Tubérculo em formação (T). 5.32. Detalhe dos espinhos tegumentares (E), membrana apical (MA) e membrana basal (MB). 5.33. Detalhe do tubérculo com fibras musculares intermediadas com expansões citoplasmáticas (C).

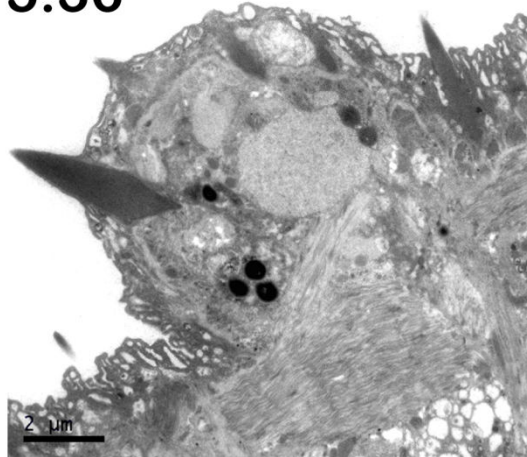
5.34



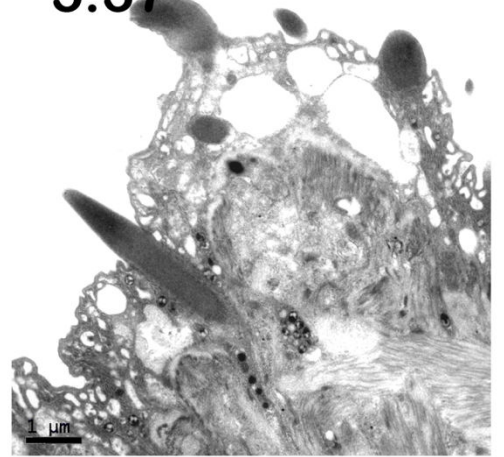
5.35



5.36

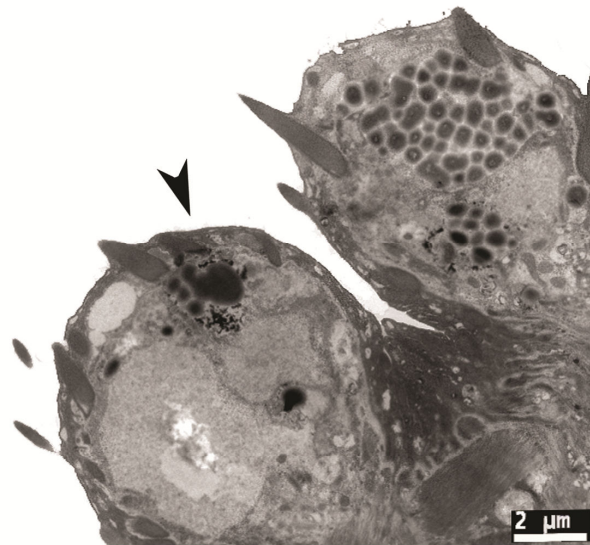


5.37



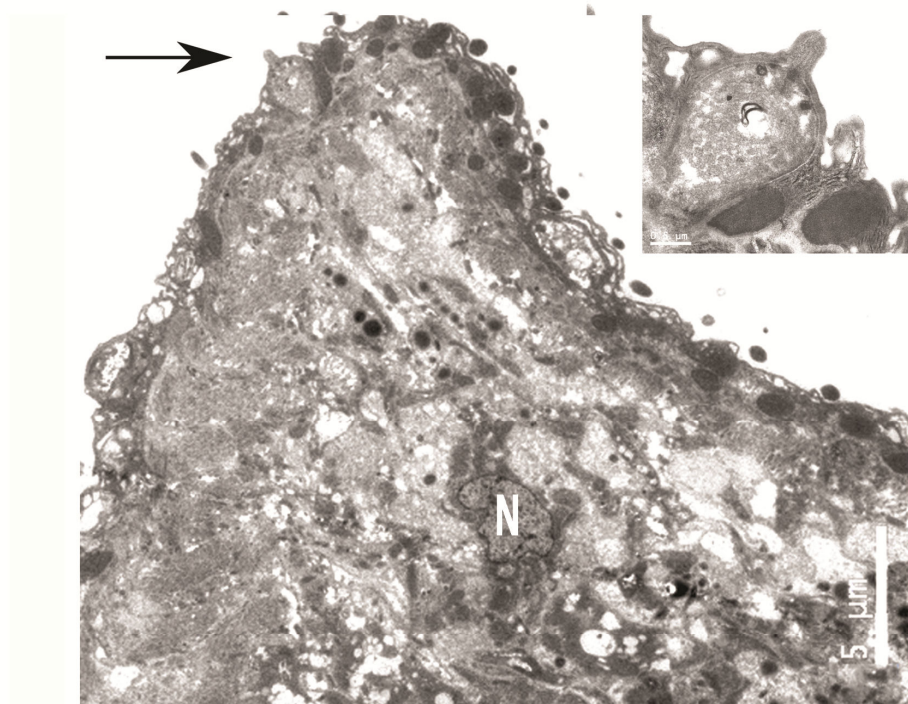
Figuras 5.34-5.37. *Schistosoma mansoni*. MET. Diferentes estágios de formação de tubérculos.

5.38

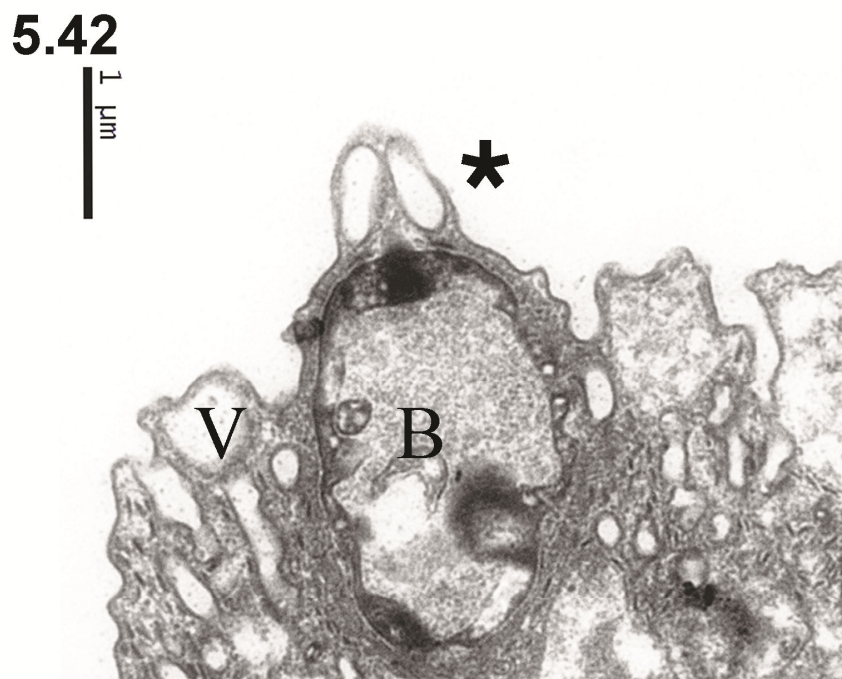
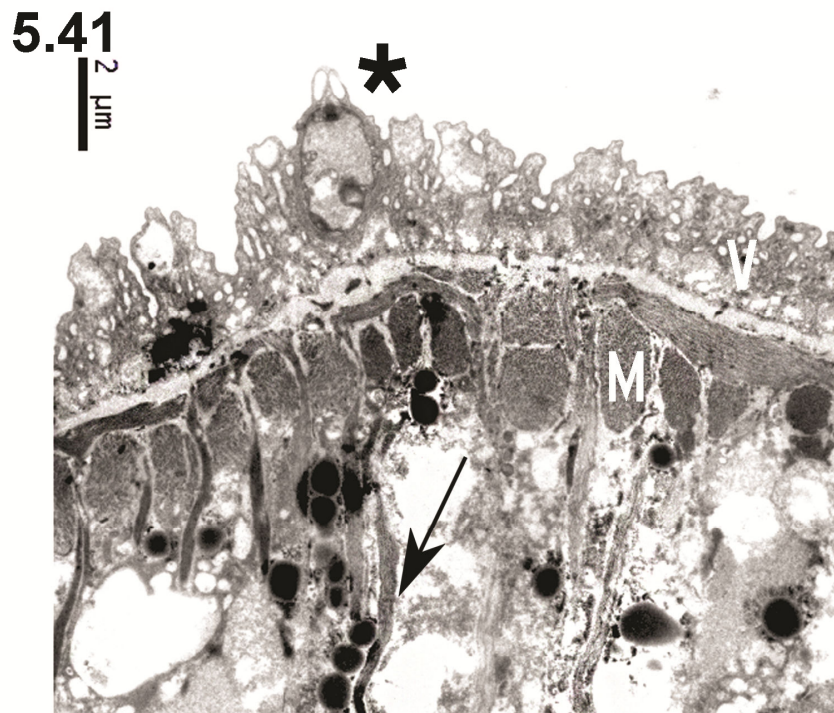


5.39

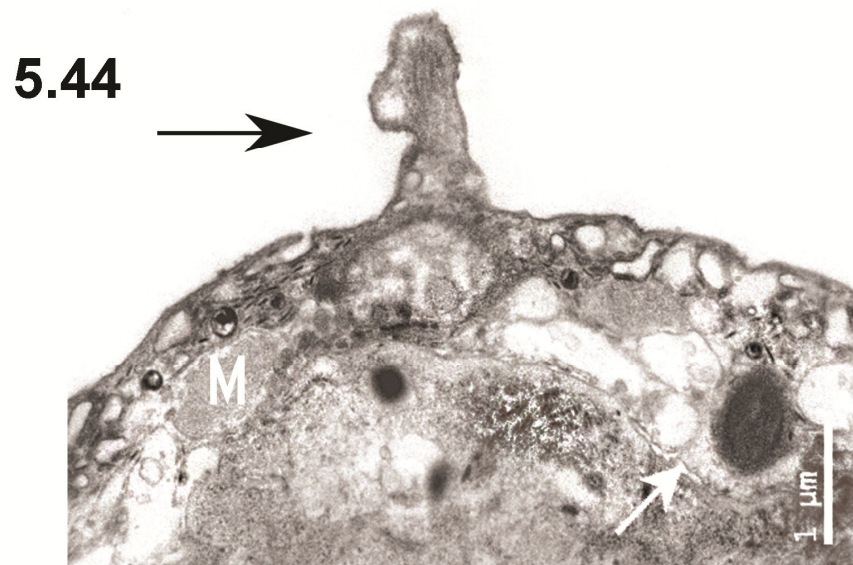
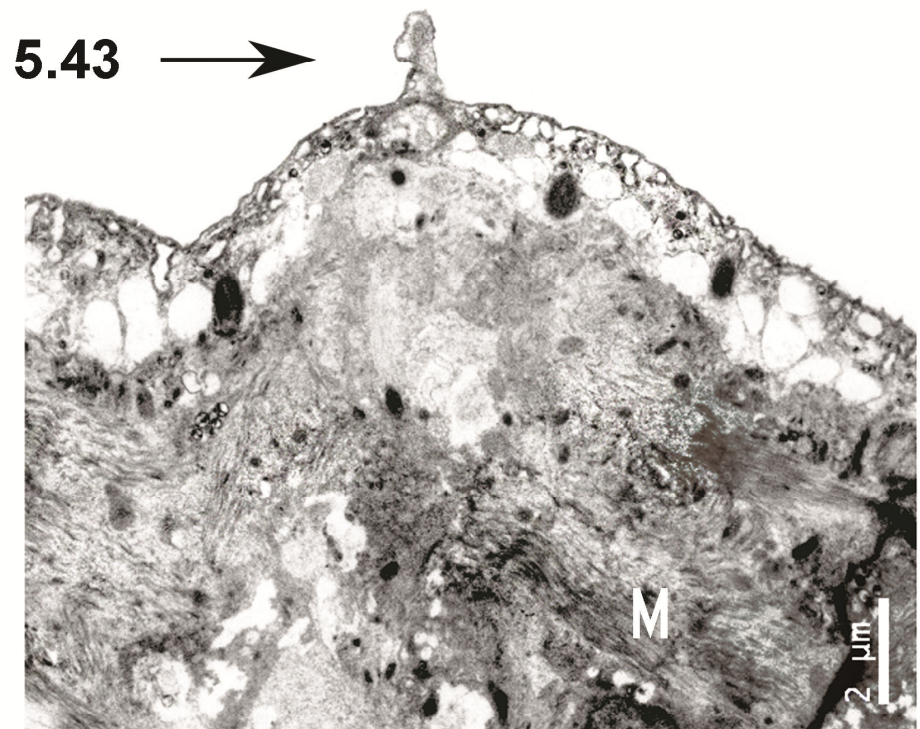
5.40



Figuras 5.38-5.40. *Schistosoma mansoni*. MET. 5.38. Vesículas eletrondensas próximas aos espinhos (cabeça de seta). 5.39. Região de transição entre tegumento dorsal e ventral com organela sensorial seta). 5.40. Detalhe do bulbo sensorial com expansão ciliar.

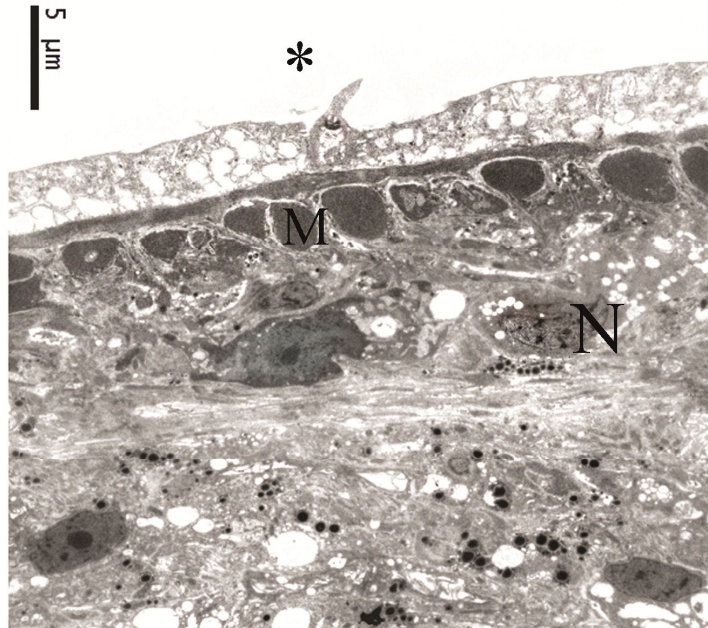


Figuras 5.41-5.42. *Schistosoma mansoni*. MET. 5.41. Tegumento com órgão sensorial (*), feixes musculares (M) e canais citoplasmáticos (seta). 5.42. Detalhe do órgão sensorial com bulbo (B) e projeção apical (*) e vesículas do sincício (V).



Figuras 5.43-5.44. *Schistosoma mansoni*. MET. Órgão sensorial uniciliado (seta preta) com feixes musculares (M) e membrana basal (seta branca).

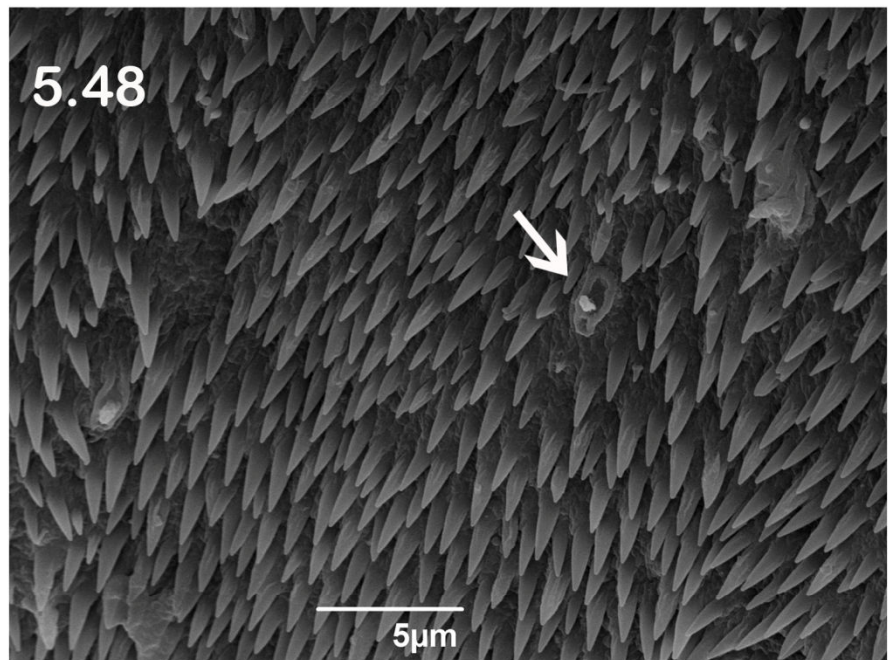
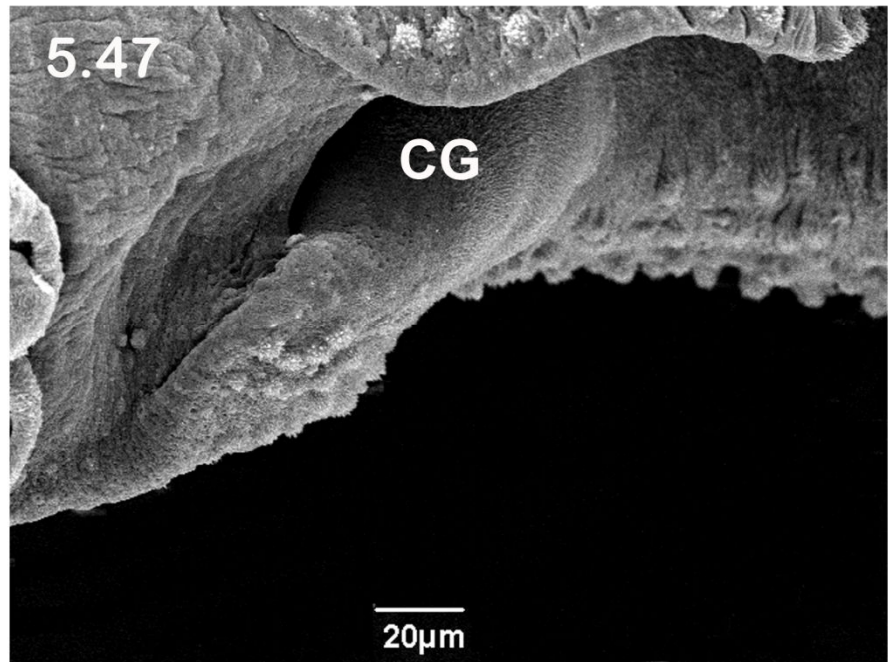
5.45



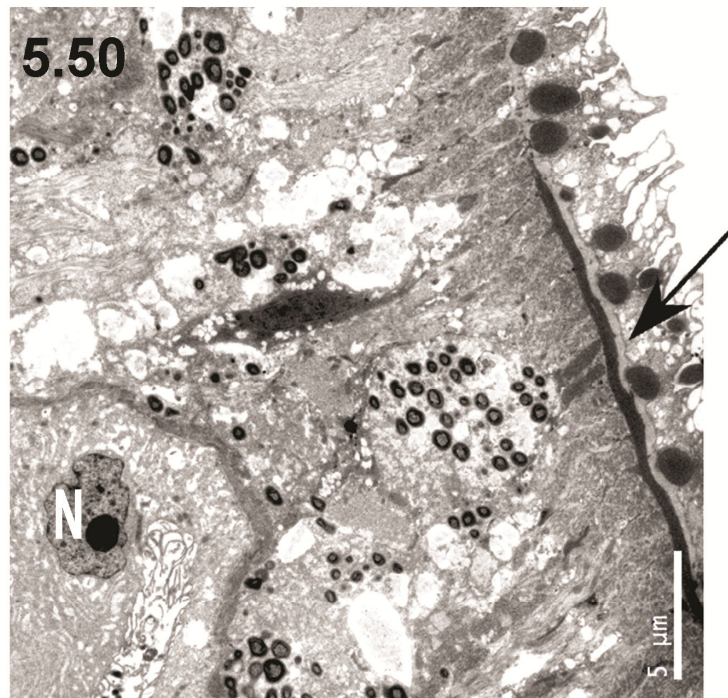
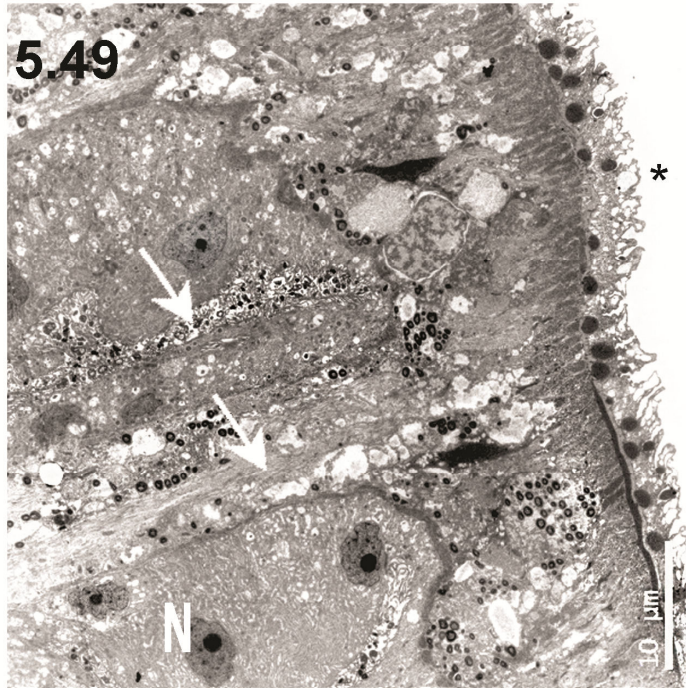
5.46



Figuras 5.45-5.46. *Schistosoma mansoni*. MET. 5.45. Órgão sensorial uniciliado (*) no canal ginecóforo. Núcleo das células (N) e feixes musculares (M). 5.46. Detalhe do órgão sensorial uniciliado com corpos basais (seta) e cílio apical (cabeça de seta); feixes musculares (M).

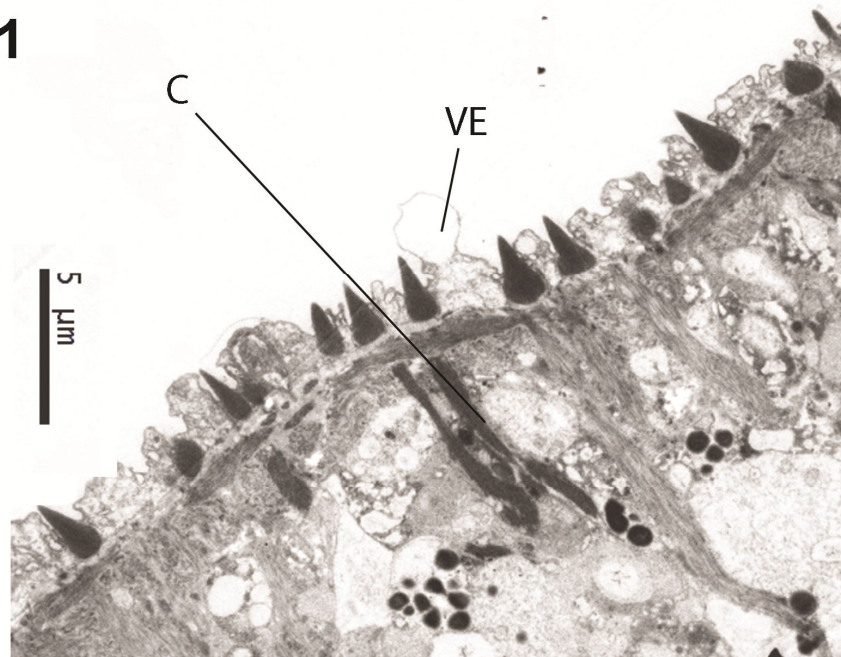


Figuras 5.47-5.48. *Schistosoma mansoni*. MEV. 5.47. Abertura do canal ginecóforo (CG). 5.48. Tegumento do canal ginecóforo completamente revestido por espinhos, com organela sensorial (seta) .

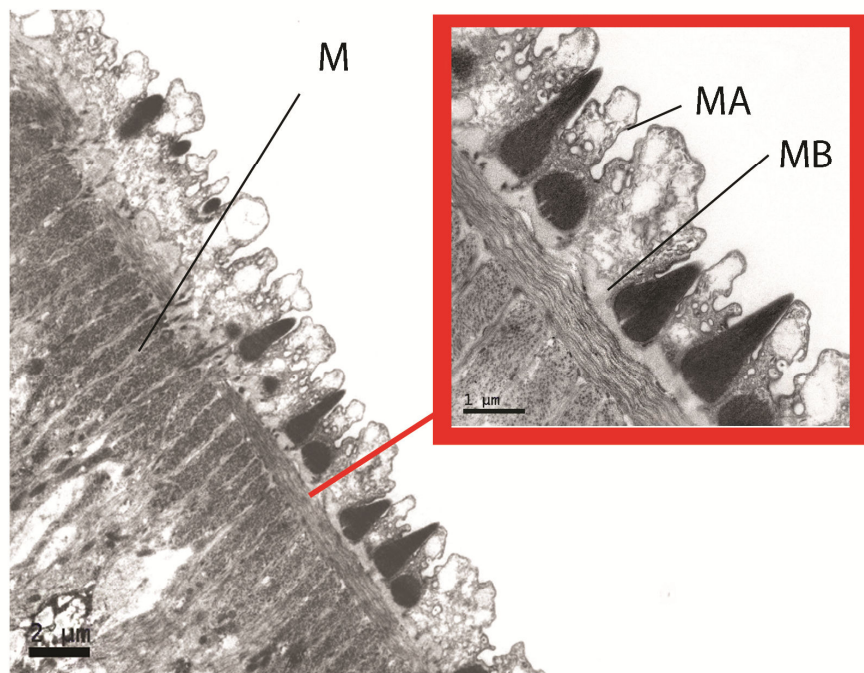


Figuras 5.49-5.50. *Schistosoma mansoni*. MET do tegumento do canal ginecóforo. 5.49. Células tegumentares com vários núcleos (N) no tegumento interno, canais citoplasmáticos (seta branca) e sincício terminal (*). 5.50. Detalhe do núcleo (N) e membrana basal (seta).

5.51



5.52



Figuras 5.51-5.52. *Schistosoma mansoni*. MET do tegumento do canal ginecóforo. 5.51. Canais citoplasmáticos (C) com conteúdo eletrondenso; vesículas eletrônicas se abrindo para o meio externo (VE). 5.52. Feixes musculares (M) e sincício. Detalhe: Membrana basal (MB) e membrana apical (MA) com espinhos.

possível evidenciar detalhes do miracídio (Figuras 5.54-5.55). No Kato-Katz 24h os ovos aparecem bem delimitados mas com poucos traços do miracídio (Figuras 5.56, 5.57).

Comparando as médias da análise do OPG das três infecções (média total) das duas técnicas, em função do tempo, observa-se que o número de ovos encontrados com a técnica de SAF no momento da leitura foi maior em 7,7% do que com Kato-Katz em 24 horas de leitura. No entanto, Kato-Katz com 12 horas de leitura da lâmina apresentou 5% a mais de ovos do que SAF 0h.

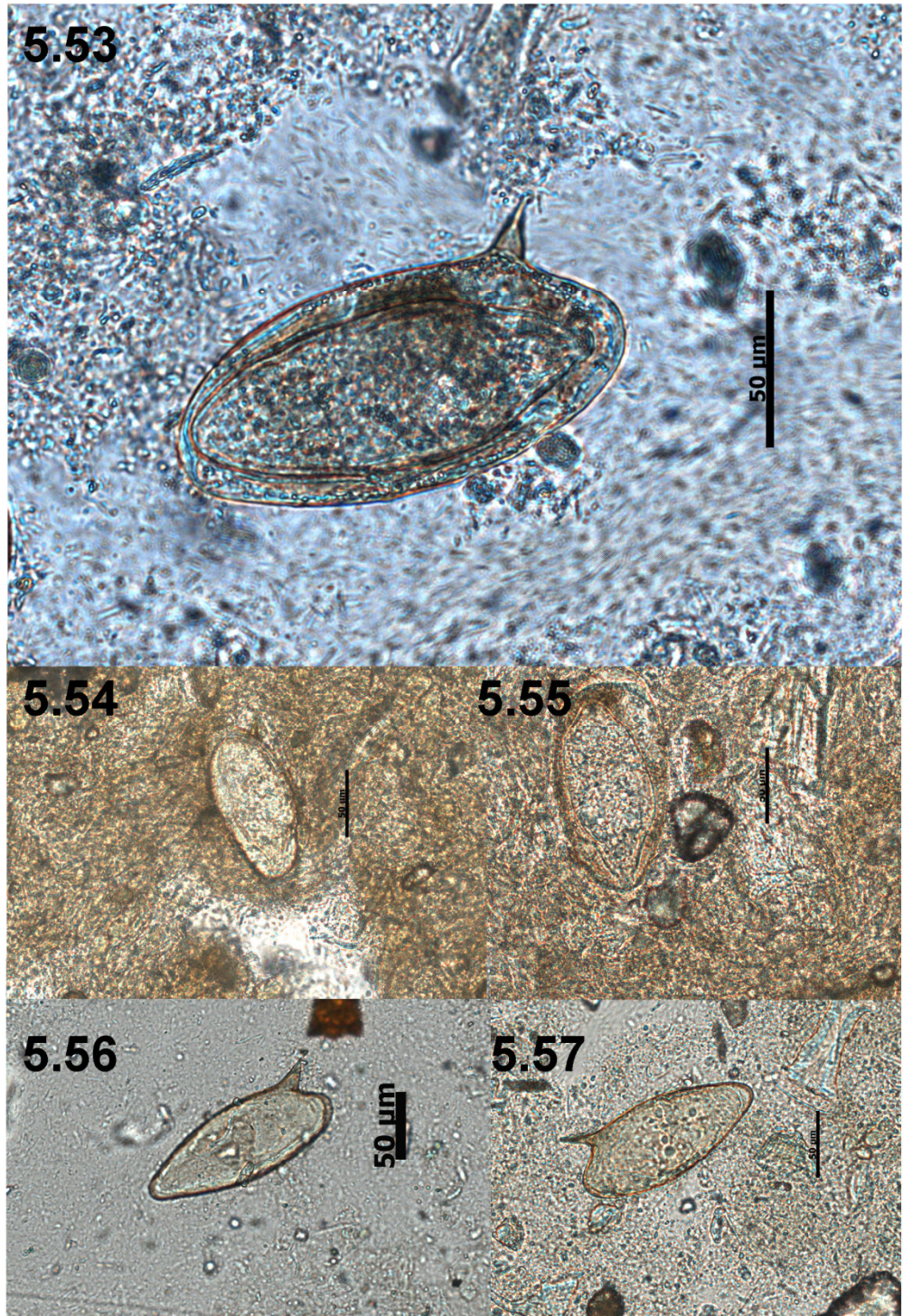
A figura 58 demonstra a diferença estatística verificada entre as técnicas realizadas por tempo de leitura das lâminas. Observa-se que não existe diferença significativa entre os resultados obtidos (pool das três infecções) com SAF no momento da montagem da lâmina (0h) e os resultados da técnica de Kato-Katz com leitura de 24 horas. O mesmo resultado foi verificado com 12 horas para as duas técnicas.

No segundo experimento verificou-se o número de ovos por grama de fezes encontrado com a técnica de SAF 1 hora foi 13,1% maior do que Kato-Katz em 24 horas de leitura. Comparando os resultados obtidos nas duas técnicas com 24 h de leitura, verifica-se que o OPG foi 32,5% maior na técnica de Kato-Katz do que SAF (Tabela 2).

Analisando estatisticamente observa-se que não há diferença significativa entre o número de ovos por grama de fezes (OPG) encontrado na técnica de SAF com leitura de 1 hora e 24 horas e entre Kato-Katz com 24 horas (Figura 59). A maior diferença ocorreu entre Kato-Katz com 1 hora em relação aos demais, pois não foram encontrados ovos.

Tabela 1 – Número de ovos por grama de fezes (OPG) de três de lâminas por técnica de diagnóstico coproparasitológico utilizada nas diferentes infecções experimentais (duas réplicas por infecção) nos seguintes intervalos de tempo: 0, 12 e 24 horas de montagem das lâminas.

| Infecções/ técnica | SAF 0h | SAF 12h | SAF 24h | Kato-Katz 0h | Kato-Katz 12 h | Kato-Katz 24h |
|-----------------------|-----------|------------|------------|-----------------|-------------------|------------------|
| Infecção 1 | 312 | 264 | 96 | 0 | 288 | 312 |
| | 216 | 192 | 144 | 0 | 216 | 288 |
| Média | 264 | 228 | 120 | 0 | 252 | 300 |
| Infecção 2 | 192 | 168 | 120 | 0 | 240 | 288 |
| | 312 | 264 | 96 | 0 | 288 | 312 |
| Média | 252 | 216 | 108 | 0 | 264 | 300 |
| Infecção 3 | 312 | 720 | 96 | 0 | 288 | 312 |
| | 840 | 288 | 336 | 0 | 984 | 504 |
| Média | 576 | 492 | 216 | 0 | 636 | 408 |
| Média total | 364 | 312 | 148 | 0 | 384 | 336 |



Figuras 5.53-5.57. Ovos de *Schistosoma mansoni*. ML. 5.53. Técnica do SAF observado em uma hora com detalhes do miracídio. 5.54-5.55. Técnica do SAF observado em 24 horas; Ovos começam a perder definição. 5.56-5.57. Técnica do KATO-KATZ observado em 24 horas, sem definição clara do miracídio.

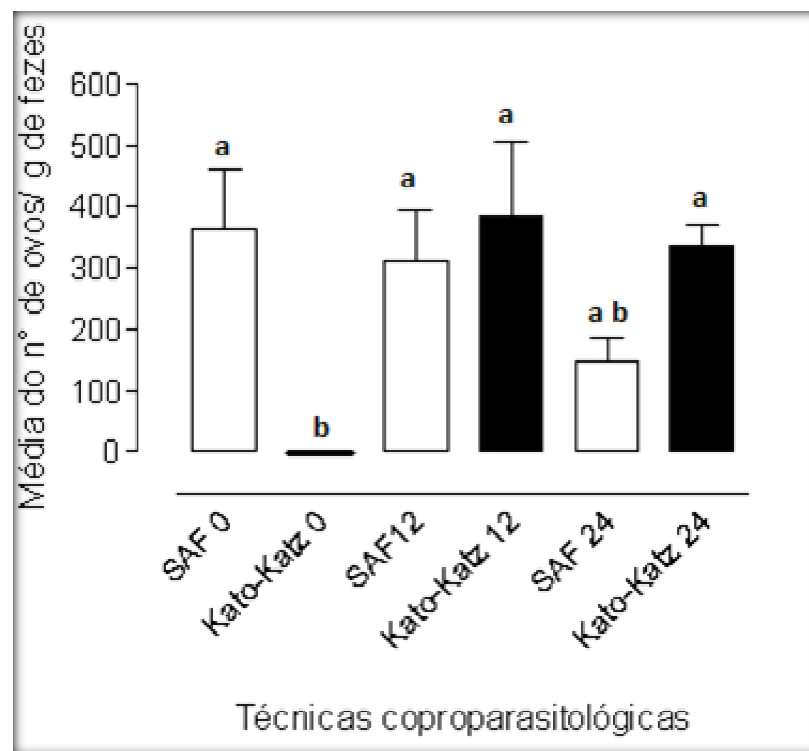


Figura 5.58 – Média de ovos por grama de fezes (OPG) encontrada nas leituras de três lâminas, utilizando as técnicas de SAF e Kato-Katz em 0, 12 e 24 horas de montagem das lâminas. Letras diferentes apresentam diferença significativa.

Tabela 2 – Número de ovos por grama de fezes (OPG) de três de lâminas por técnica de diagnóstico coproparasitológico utilizada nas diferentes infecções experimentais (duas réplicas por infecção) nos intervalos de 1 e 24 horas após a montagem das lâminas.

| Infecções/ técnica | SAF 1h | SAF 24h | Kato-Katz 1h | Kato-Katz 24 h |
|-----------------------|-----------|------------|-----------------|-------------------|
| Infecção 1 | 120 | 72 | 0 | 168 |
| | 192 | 120 | 0 | 384 |
| | 168 | 144 | 0 | 48 |
| Média | 160 | 112 | 0 | 200 |
| Infecção 2 | 120 | 48 | 0 | 192 |
| | 168 | 72 | 0 | 216 |
| | 288 | 96 | 0 | 264 |
| Média | 192 | 72 | 0 | 224 |
| Infecção 3 | 360 | 336 | 0 | 312 |
| | 384 | 264 | 0 | 336 |
| | 576 | 240 | 0 | 144 |
| Média | 440 | 280 | | 264 |
| Média total | 264 | 154,6 | 0 | 229,3 |

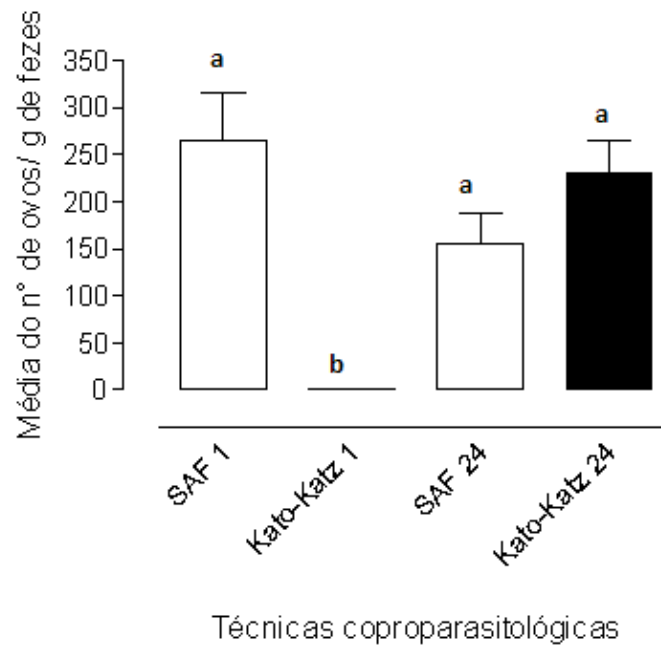


Figura 5.59 – Média de ovos por grama de fezes (OPG) encontrada nas leituras de três lâminas, utilizando as técnicas de SAF e Kato-Katz em 1 e 24 horas de montagem das lâminas. Letras diferentes apresentam diferenças significativas.

6. DISCUSSÃO

A esquistossomose mansônica foi introduzida no continente americano através de escravos originários da Guiné, Angola, antigo Congo e de Moçambique que se estabeleceram inicialmente nas áreas de produção canavieira do nordeste brasileiro. Acredita-se que estas regiões apresentaram condições ecológicas favoráveis para a instalação do ciclo biológico do parasito (Chieffi & Waldman, 1988).

O tratamento e o controle da esquistossomose se baseia no uso do praziquantel (PZQ), mas a droga tem atividade moderada contra parasitos jovens (Doenhoff *et al.*, 2008; Manneck *et al.*, 2010). Outras drogas como a mefloquina (MQ) têm sido testadas com resultados satisfatórios, diminuindo ou mesmo erradicando as fêmeas em experimentos com animais de laboratório (Keiser *et al.*, 2009). O experimento com drogas têm como alvo o tegumento dos machos porque nem sempre as fêmeas entram em contato direto com o microhabitat do hospedeiro, já que se encontram quase sempre no canal ginecóforo do macho (Lima *et al.*, 2011).

Partindo de uma visão ampla para um diagnóstico estrutural do *S. mansoni*, o estudo por microscopia eletrônica de varredura de machos revelou o corpo com porção anterior formada por uma ventosa oral e outra ventosa ventral ou acetábulo. A presença de espinhos na ventosa oral e a observação de que na ventosa ventral os espinhos eram menores ou ausentes na superfície externa, confirmam as observações de Miller *et al.* (1972) e Carvalho *et al.* (2008). A presença de organelas sensoriais observadas na região entre as ventosas como descrito no presente trabalho não foram referidas por Lima *et al.* (2011).

Nas observações por MEV, o macho adulto apresentou numerosos tubérculos com espinhos dispostos na região dorsal ao longo do corpo de verme adulto, que diminuem de expressão na região posterior terminal, de acordo com os dados de Carvalho *et al.* (2008) e Lima *et al.* (2011). Os tubérculos dorsais do tegumento do macho têm seu início imediatamente após o acetábulo. Nessa mesma área, mas na região ventral, dá-se início ao canal formado pela dobra da própria região lateral do corpo do macho, o canal ginecóforo, que alberga a fêmea.

O tegumento do *S. mansoni* é uma estrutura adaptada para absorção de nutrientes e excreção de substâncias, havendo renovação constante da superfície externa do sincício (Shuha *et al.*, 2000; Faghiri *et al.*, 2010). Proteínas do tegumento são responsáveis pela

manutenção da resposta imune ao hospedeiro e pela reposição dos danos causados à superfície externa (Hoffmann *et al.*, 1996). As múltiplas funções do tegumento mostram a importância do seu estudo, no entanto, os mecanismos de formação dos tubérculos ainda não estão bem explorados.

A superfície normal do tegumento de *S. mansoni* foi descrita através de MET por diferentes autores, sendo caracterizado como um sincício complexo bem dotado de redes membranosas (Morris & Threadgold, 1968; Hockley, 1973; Kuntz *et al.*, 1976; Basch & Basch, 1982; Sobhon *et al.*, 1984). Na técnica da fluorescência com a faloidina conjugada a TRICT, o tegumento externo se apresentou formado por fibras musculares circulares estando as fibras longitudinais organizadas por baixo, numa camada mais profunda, confirmando a descrição feita por Mair *et al.* (2000).

Neste estudo, através das técnicas utilizadas, nós tentamos entender melhor e evidenciar a origem dos tubérculos em condições naturais e com isso fornecer elementos de base importantes para futuras comparações com estudos farmacológicos que venham a ser realizados no futuro.

O tegumento sincicial do *S. mansoni* apresentou-se delimitado pelas duas membranas: a membrana basal subjacente ao tecido muscular e a membrana externa ou plasmática superficial. Foi possível mostrar que a intensa formação de vesículas eletrólucidas, eletrondensas e corpos alongados na região próxima ao núcleo são importantes organelas na formação dos tubérculos. Estas vesículas se dirigem através de canais citoplasmáticos para o tegumento externo, e passam por entre os feixes musculares empurrando a membrana basal e organelas adjacentes, formando tubérculos projetados no tegumento. As maiores concentrações das vesículas na superfície do tegumento, entre a membrana basal e apical, estão em acordo com as observações de Hockley *et al.* (1973), Wilson & Barnes (1974) e McLaren (1980).

Alterações no tegumento foram descritas devido à tendência do parasito em destacar fragmentos da superfície externa como reação a diferentes meios de incubação. Kalapothakis *et al.* (1988) relataram que a incubação em tampão fosfato resultou na formação interna de bolhas e eliminação de vesículas pelo tegumento, além de perda dos espinhos. Manneck *et al.* (2010) referiram que o uso de mefloquina alterou o tegumento de esquistossômulos resultando na diminuição do tamanho dos espinhos em todo o corpo; nos machos adultos,

houve perda dos tubérculos e espinhos, dando aparência fibrosa ao tegumento e nas fêmeas, a destruição do tegumento deixou visível a membrana basal.

Testes com oxaminiquine realizados por Kohn *et al* (1982) mostraram que as alterações no tegumento ocorrem por desagregação do sistema de fibras musculares, intensa formação de vacúolos e edema formando lesões tipo “bolha”. Relatos semelhantes foram descritos por Lima *et al.* (2011) que realizaram testes *in vitro* da alicina (alho) no tegumento de vermes adultos de *S. mansoni*.

A descrição do processo de formação dos tubérculos do tegumento do macho em condições normais, mostram a importância do estudo desta área como alvo de futuros estudos com drogas. É importante enfatizar que na superfície ventral do corpo dos machos onde não ocorre a formação de tubérculos, o tegumento é mais simples e organizado, com uma camada muscular mais reforçada que diminuiria a formação de numerosos canais citoplasmáticos responsáveis pelo carreamento de vesículas para o tegumento externo.

Para o diagnóstico laboratorial da esquistossomose mansônica utiliza-se exames coprocópicos com análise parasitológica através de diferentes técnicas qualitativas e quantitativas. As técnicas qualitativas, geralmente de baixo custo, fáceis e rápidas de se realizarem, identificam a presença do parasito, mas as técnicas quantitativas, além disso, preconizam o número de ovos por grama de fezes (OPG) e possibilitam estimar a carga parasitária. Estes dados são extremamente importantes como indicadores epidemiológicos para avaliação e aprimoramento das medidas de controle da doença (Rabello *et al.*, 2008).

Esta dissertação é resultado de uma parceria entre a Fiocruz e o governo de Angola, a fim de promover a capacitação e a formação dos profissionais envolvidos no diagnóstico e controle da esquistossomose naquele país. Devido a este fato, preconizou-se o estudo da sensibilidade da técnica de Kato-Katz, comparando com uma variante da mesma, ora denominada SAF, devido à substituição do fixador verde malaquita pelo fixador SAF, empregado anteriormente para protozoários. A técnica de Kato-Katz é empregada de forma rotineira no diagnóstico da esquistossomose mansônica, sendo preconizada pela OMS para o diagnóstico laboratorial em campo de áreas endêmicas (OMS, 2011). No entanto, não é possível, segundo a descrição da técnica a leitura das lâminas imediatamente após a montagem das mesmas, sendo necessário no mínimo 4 horas de intervalo entre a montagem e a leitura.

Nos resultados dos experimentos realizados em função do tempo, verificou-se que não se observa ovos de *S.mansoni* utilizando a técnica de Kato-Katz com leituras realizadas em 0h (imediatamente após a montagem) e com 1 hora após a montagem. Este dado corrobora os fornecidos pelo fabricante do kit comercial, mas constitui um problema de saúde pública, pois devido à dificuldade de retorno dos pacientes aos centros de diagnóstico para realização de tratamento, seria importante a utilização de uma técnica quantitativa de fácil realização e rápida. Com a substituição do fixador, a técnica de Kato-Katz passou a adquirir esta eficiência, ou seja, a técnica denominada de SAF (0h), modificada do Kato-Katz, apresentou os resultados estatisticamente iguais aos de Kato-Katz com 24 horas.

Com os resultados obtidos na análise das técnicas coproscópicas em função do tempo foi possível simular e estabelecer diagnósticos rápidos e eficientes com no máximo 1 hora, promovendo assim, a definição da estratégia imediata de tratamento do paciente, avaliando o grau de morbidade, a partir da carga parasitária encontrada. Desta forma, também é possível verificar a ampliação ou redução da área endêmica e o planejamento a curto e médio prazo de ações de controle.

A aplicação da técnica Kato-Katz modificada, denominada de SAF, para o diagnóstico laboratorial da esquistossomose mansônica, será um desafio a ser conquistado no Hospital Central Dr. Antônio Agostinho Neto do Lubango, estado da Huíla em Angola. Com o emprego da mesma, será possível o diagnóstico e o tratamento da esquistossomose mansônica de forma rápida e eficiente.

O conhecimento ora adquirido, sobre a morfologia, ciclo biológico, diagnóstico ultrastrutural e laboratorial do *Schistosoma mansoni* no Instituto Oswaldo Cruz (IOC), permitirá aumentar o leque do conhecimento e informação sobre a esquistossomose mansônica, em Angola e servirá como material metodológico para futuros estudos epidemiológicos.

7. CONCLUSÕES

O diagnóstico ultraestrutural diferencial do *S. mansoni* é melhor caracterizado nos machos do que nas fêmeas, devido à presença de tubérculos na superfície dorsal do tegumento.

Em condições naturais, os tubérculos do macho são formados por evaginações do tegumento que aparecem entre as fibras musculares circulares e longitudinais, elevando as membranas basal e apical. Entre as membranas há vesículas eletrondensas, eletrólúcidas e corpos alongados formados na região próxima ao núcleo que chegam à superfície externa do tegumento através de canais citoplasmáticos.

O canal ginecóforo apresenta espinhos pequenos, uniformes e organelas sensoriais uniciliadas com a camada entre a membrana basal e a apical mais homogênea.

A técnica quantitativa de SAF (Kato- Katz modificada) é mais rápida e eficiente, permitindo a melhoria da qualidade do diagnóstico da esquistossomose intestinal, a fim de planejar adequadamente estratégias de tratamento e controle desta doença.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Barbosa CS, Pieri OS, Silva CB, Barbosa FS. Ecoepidemiology of urban Schistosomiasis in Itamaracá Island, Pernambuco, Brasil. *Rev. Saúde Pública*. 2000; 34 (4): 337-41.

Barbosa CS, Domingues ALC, Abath F, Montenegro SM, Guida U, Carneiro J, Tabosa B, Spinell V. Epidemia de Esquistossomose aguda na praia de Porto de Galinhas, Pernambuco, Brasil. *Cad. Saúde Pública*. 2001; 17 (3): 725-728.

Barreto ML, Smith DH, Sleigh AC. Implications of of faecal egg e count variation when using the Kato. Katz, métodos to assess. *Schistosoma mansoni* infections. *Trans Royal Soc. Trop. Med. Hyg.* 1990; 84: 554- 555.

Basch PF, Basch N. *Schistosoma mansoni*: scanning electron microscopy of esquistossomula, adults and eggs grown *in vitro*. *Parasitol.* 1982; 85:333-338.

Bogers JJPM, Nibbeling MAM, Van Mark AE, Deelder AM. Immunofluorescent visualization of the excretory and gut system of *Schistosoma mansoni* by confocal laser scanning electron microscopy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1994; 50 (5): 612- 619.

Cavalcanti MGS, Araújo HRC, Paiva MHS, Silva GM, Barbosa, CCGS, Silva LF, Brayner FA, Alves, LC. Ultrastructural and cytochemical aspects of *Schistosoma mansoni* cercaria. *Micron* 2009; 40: 394-400.

Carvalho OS, Amaral RS, Dutra LV, Scholte RGC, Guerra MAM. Distribuição espacial de *Biomphalaria glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila*, hospedeiros intermediários do *Schistosoma mansoni* no Brasil. 2008. In OS Carvalho, PM Zech

Coelho, HL Lenzi (eds.), *Schistosoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar*, Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, 1124 pp.

Chieffi, PP, Waldman EA. Aspectos particulares do comportamento epidemiológico da

esquistossomose mansônica no Estado de São Paulo, Brasil. *Cad. Saúde Pública* 1988; 4 (3): 257-275.

Coura, JR. Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias; volume II; 2005; Editora Guanabara Koogan S.A.

Dajem, SMB. Scanning Electron Microscopical Studies on *Schistosoma mansoni* cercariae Exposed to Ultraviolet Irradiation. *Australian J Basic and App. Sci.* 2007; 1 (4): 776-784.

Doenhoff MJ, Ciolib D., Utzinger J. Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. *Current Opinion Infec. Dis.* 2008; 21:659–667.

Engels D, Sinzinkayo E, Gryseels B. 1996. Day-to-day egg count fluctuation in *Schistosoma mansoni* infection and its operational implications. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1996; 54:319-324.

Engels D, Chitsulo L, Montresor A, Savioli L. The global epidemiological situation of schistosomiasis and new approaches to control and research. *Acta tropica* 2002; 82: 139-146.

Faghiri Z, Camargo SMR, Huggel K, Forster IC, Ndegwa D, Verrey F, Skelly PJ. The Tegument of the Human Parasitic Worm *Schistosoma mansoni* as an Excretory Organ: The surface Aquaporin SmaQP Is a Lactate Transporter. *Plus One* 2010; 5 (5): 1-9.

Grault CE, Mello-Silva CC, Costa, MJFS, Cruz OJ, Almeida A, Silva MQ, Bezerra R, Costa VA. Potential spread of Schistosomiasis in the periphery of greater metropolitan region of Rio de Janeiro. *Mem. Inst. O. Cruz* 1998; 93 (supp II): 293-294.

Hall IC, Rebec GV, Hurley LM. Serotonin in the inferior colliculus fluctuates with behavioral state and environmental stimuli. *J. Exp. Biol.* 2010; 213: 1009-1017.

Hockley DJ. Ultrastructural of the tegumento f *Schistosoma*, p. 233-305. In B, Dawes; *Advances in Parasitology* 1973. Academic. Press. London.

Hockley DJ, McLaren DJ. *Schistosoma mansoni*: Changes in the outer membrane of the tegument during development from cercaria to adult worm. *Int. J. Parasitol.* 1973; 3 (1): 13-20.

João RCF. Contribuição para o conhecimento dos professores e alunos do 7º e 8º ano da escola do 1º ciclo do Município da Humpata. Lubango. Sobre a Schistosomíase Urinária. Dissertação de Bacharelado. 2009. Universidade Dr. António Agostinho Neto; Instituto Superior de Ciências de Educação do Lubango. Huíla. Angola, 70 p.

Johnton CF, Shaw C, Halton DW, Fairweather I. Confocal Scanning Laser Microscopy and Helminth Neuroanatomy. *Parasitol. Today* 1990; 6 (9): 305-308.

Junod L. Technique Coprologique Nouvelle Essentially Destinee a la Concentration des Trophozoites d'Amibes. *Bul. Soc. Pathol. Exot.* 1972; 65:390-398.

Kalapothakis E, Hirst E, Evans WH. Perturbations of Topography of the Tegument Of Adult *Schistosoma mansoni*. A Scanning Electron Microscope Study. *Brazilian J Med. Biol. Res.* 1988; 21: 961-969;

Katz N, Peixoto SV. Análise Crítica da Estimativa do número de portadores de esquistossomose mansoni no Brasil. *Rev Soc. Bras Med Trop.* 2000; 33 (3): 303-308.

Keiser J, Chollet J, Xiao SH. et al. Mefloquine - an aminoalcohol with promising antischistosomal properties in mice. *PLoS Neglected Trop. Dis.* 2009; 3: e-350.

Kohn ML, Alvarez L, Katz N.. Transmission and Scanning electron Microscopical Studies in the Tegument of Male *Schistosoma mansoni* after Oxamiquine Treatment. *Ann Parasit. Hum Comp.* 1982; 57 (3): 285-291.

Kussel JR, Mcveigh, Thornhill JA. The *Schistosome* excretory system: a key to regulation of metabolism, drug excretion and host interaction. *Trends in Parasitol.*, 2009; 25 (8): 353-358;

Lima CMBL, Freitas FIS, Morais LCBL, Cavalcante MG, Silva LF, Padilha R JR., Barbosa, C. G. S., Santos, F. A. B., Alves, L. C., Diniz, M. F. F. M. Ultrastructural Study on the morphological changes to male worms of *Schistosoma mansoni* after in vitro exposure to allicin. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2011; 44 (3): 327-330.

Machado-Silva JR, Pelajo-Machado M, Lenzi HL, Gomes DC. Morphological Study of Adult Worms of *Schistosoma mansoni*, Sambon, 1907 by Confocal Laser Scanning Microscopy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1998; 93 suppl, 1: 303-307.

McLaren D J. *Schistosoma mansoni*: The parasite surface in relation to host immunity. 1980. Vol 1, xv, 229 p.

Mair GR, Maule AG, Day TA, Halton DW. A confocal microscopical study of the musculature of adult *Schistosoma mansoni*. *Parasitol.* 2000; (121): 163-170.

Manneck T, Haggemuller Y, Keiser J. Morphological effects and tegumental alterations induced by mefloquine on Schistosomula and adult flukes of *Schistosoma mansoni*. *Parasitol.* 2010; 137 (1): 85– 98.

Miller FH, Tulloch GS, Kuntz RE. Scanning Electron Microscopy Of Integumental Surface of *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.* 1972; 58 (4): 693-698.

Organização Mundial da Saúde. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/es/>
Acessado em 7/12/2011.

Peters PA, Warren KS. A rapid method of infecting mice and other laboratory animals with *Schistosoma mansoni*: subcutaneous infecting. *J. Parasitol.* 1969; 55: 558.

Rabello A. Diagnosing Schistosomiasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1997: 669-676.

Rabello A, Pontes LA, Martin JE, Montenegro SML, Moraes CNL. Diagnóstico

parasitológico, imunológico e molecular da Esquistossomose mansoni. In: Carvalho OS, Coelho PMZ, Lenzi HL. *Schistosoma mansoni* e Esquistossomose: uma visão multidisciplinar, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. Cap 31. 895-926p. 2008.

Rey L. *Parasitologia: parasitas e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais*, 4ª Edição, Editora Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 2008.

Riad NHA, Taha HA, Mahmoud YI. Effects of garlirc on albino mice experimentally infected with *Schistosoma mansoni*: a parasitological and ultrastructural study. *Trop. Biomed.* 2009; 26 (1): 40-50.

Shuhua X, Binggui S, Chollet J, Tanmer M. Tegumental Changes in adult *Schistosoma mansoni* harboured in mice treated with praziquatel enantiomers. *Acta Tropica* 2000; 76: 107-117.

Steinmann P, Keiser J, Bos R, Tanner M, Utzinger J. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. *The Lancet Infect. Diseases* 2006; 6:441-425.

WHO. <http://www.who.int/Schistosomiasis/epidemiology/table3/em/print.html>. Acessado em 2010.

Xavier AML, Magalhães JAS, Cunha GSP, Silva AC, Tavares, DAG, Sarro MF, Neto, AHAM. Morphological Tegument Alterations of adult *Schistosoma mansoni*, harbored in non anti-helminthic treated, high-immune-tolerogenic and low-inflammatory mice. *Acta Tropica* 2010; 116: 95-99.