

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE BIOCÊNCIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA

MECANISMO DE INTERAÇÃO MAGNÉTICA DOS OVOS DE *SCHISTOSOMA* spp.
E CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DA CEPA ESTEIO, RIO GRANDE DO SUL.

Rafael Lucyk Maurer

Orientador: Prof. Dr. Carlos Graeff-Teixeira

TESE DE DOUTORADO

PORTO ALEGRE – RS – BRASIL

2012

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	III
AGRADECIMENTOS.....	IV
GLOSSÁRIO.....	VI
RESUMO	IX
ABSTRACT.....	X
APRESENTAÇÃO	XI
<u>CAPÍTULO 1</u> - Características biológicas da cepa Esteio de <i>Schistosoma mansoni</i> em infecção experimental de camundongos e moluscos do gênero <i>Biomphalaria</i>	14
<u>CAPÍTULO 2</u> - Identificação de elementos químicos potencialmente suscetíveis de magnetização presentes na casca do ovo de <i>Schistosoma mansoni</i>	34
<u>CAPÍTULO 3</u> - Caracterização magnética dos ovos de <i>Schistosoma</i> spp.....	58
CONCLUSÕES GERAIS	70
ANEXO	71

DEDICATÓRIA

A minha mãe Salete, meu pai Cláudio (*in memorian*), meus irmãos
Valéria e Leonardo, meu cunhado Guilherme e minha
cunhada Stacey e aos meus sobrinhos Isabele e
Nathan. Que me apoiaram em todos os momentos
da minha vida. E seguem.
Dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Graeff-Teixeira pela amizade, orientação desde os tempos de iniciação científica até o final do doutorado. A minha paixão pela ciência e pesquisa eu devo a ele.

Ao meu orientador na Austrália Malcolm K. Jones por ter me recebido em seu laboratório por ter apoiado e encontrado soluções para os problemas surgidos durante o desenvolvimento das atividades.

A Profa. Dra. Ana Cristina pelo interesse no tema proposto e acompanhar a evolução do meu doutorado. Amiga nas horas difíceis e alegres.

A minha namorada Mirella Cristiane de Souza pelo amor, doação e me tornar um homem melhor. Eterno agradecimento meu amor.

Ao companheiro da minha mãe, Fernando Vargas Souto pela preocupação com o andamento de meu projeto e apoio quando foi necessário.

Aos professores Tiziano Dalla Rosa da Faculdade de Química e Airton Cabral de Andrade da Faculdade de Física pelo aconselhamento durante o curso do meu projeto.

Ao pessoal do Laboratório de Biologia Parasitária pela ajuda, carinho e paciência nos dias de estresse.

A técnica Priscilla Sundin pela amizade e suporte científico no andamento das atividades do doutorado.

Aos familiares que sempre estiveram presente em minha vida.

Aos amigos do Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia e Terapia Gênica do HCPA pelo convívio e oportunidade de crescer profissionalmente em especial a Dra. Themis, Dr. Jorge, Dr. Carlos, Dra. Ursula, Dra. Sandra, Álvaro, Thaís, Gabriela, Laura, Caroline.

A Dra. Fernanda Oliveira por sempre ter me ajudado e me apoiado a seguir no mundo da ciência. Com certeza uma grande amiga.

Minha tia Claudete pelas correções realizadas na tese e perguntas desafiadoras a respeito do tema do meu doutorado.

Ao Áureo e Maria Emília, Ana e Rodolfo, familiares da minha namorada por terem me recebido de braços abertos na família.

A Profa. Judith Scliar pelas aulas de inglês e ajuda no exame de inglês TOEFL.

A turma do *Parasite Cell Biology e Division of Infectious Diseases* do *Queensland Institute of Medical Research* por terem me recebido com carinho e simplicidade, em especial ao David, Yee e Charlene.

Aos pesquisadores e técnicos da *The University of Queensland*, Eunice, Graeme e Erica pelo auxílio no desenvolvimento das atividades.

Aos amigos Luis Pedro Spillari e Monica Schneider por terem me recebido em sua casa durante minha passagem no exterior e me ajudado muito na adaptação e orientação.

Aos “brasileiros australianos” Ronaldo, Karina, Marcos, Angélica e Claudemir.

Ao Zul Othman e Jeff pela hospedagem e amizade construída.

Aos amigos de São Borja por sempre estarem ao meu lado quando foi preciso.

Aos amigos da PUC-RS.

A secretária do PG em Zoologia Luana.

Ao CNPq e CAPES pelas bolsas.

A PUC-RS pela estrutura fornecida.

GLOSSÁRIO

- **Espectroscopia por dispersão de energia (EDS):** a microanálise consiste na medida de raios-X característicos emitidos de uma região microscópica da amostra bombardeada por um feixe de elétrons. As linhas de raios-X característicos são específicas do número atômico da amostra e o seu comprimento de onda ou sua energia podem ser utilizados para identificar o elemento que está emitindo a radiação.
- **Aceleração de voltagem:** A aceleração dos elétrons do feixe primário é determinada pela diferença de potencial entre o cátodo e o ânodo no gerador de elétrons, sendo a energia do feixe gerado medido em elétron-volts (eV). Quanto maior for a tensão aplicada maior será a aceleração e a energia do feixe de elétrons. A consequência disto é uma maior profundidade de penetração do feixe e um maior volume de interação, que também depende de outros fatores, como por exemplo, do número atômico dos elementos (Z).
- **Elétrons retroespalhados (BSE):** os elétrons retroespalhados, por definição, possuem energia que varia entre 50eV até o valor da energia do elétron primário. O sinal de BSE é resultante das interações ocorridas mais para o interior da amostra e proveniente de uma região do volume de interação abrangendo um diâmetro maior do que o diâmetro do feixe primário. A imagem gerada por esses elétrons fornece diferentes informações em relação ao contraste que apresentam: além de uma imagem topográfica (contraste em função do relevo) também se obtém uma imagem de composição (contraste em função do número atômico dos elementos presentes na amostra).
- **Elétrons secundários (SE):** os elétrons secundários no microscópio eletrônico de varredura resultam da interação do feixe eletrônico com o material da amostra. Estes elétrons resultantes são de baixa energia (<50eV) e formarão imagens com alta

resolução (3-5 nm). O contraste na imagem é dado, sobretudo, pelo relevo da amostra, que é o principal modo de formação de imagem no MEV. Os elétrons secundários, elétrons de baixa energia, gerados pelas interações elétron-átomo da amostra têm um livre caminho médio de 2 a 20 nm, por isso, somente aqueles gerados junto à superfície podem ser reemitidos e, mesmo estes, são muito vulneráveis à absorção pela topografia da superfície.

- **Imagens em campo escuro anular (HAADF):** Imagem de campo escuro anular é um método de mapear amostras. Estas imagens são formadas por coletar-se elétrons dispersos com um detector de campo escuro anular sendo altamente sensível a variações no número atômico dos átomos da amostra (imagens de contraste Z).
- **Magnetismo:** é uma propriedade cuja natureza é de origem elétrica e está relacionada com uma carga em movimento. As propriedades magnéticas dos materiais têm sua origem na estrutura eletrônica dos átomos. Do ponto de vista clássico, são dois tipos os movimentos, associados ao elétron que podem explicar a origem dos momentos magnéticos: o momento angular orbital do elétron e o momento angular do spin do elétron.
- **Susceptibilidade:** é a resposta do material a um campo aplicado, caracterizada pelo comportamento da magnetização. Usada para descrever o comportamento magnético dos materiais.
- **Propriedades magnéticas:** as propriedades magnéticas dos materiais têm sua origem nos átomos, pois quase todos os átomos são dipolos magnéticos naturais e podem ser considerados como pequenos ímãs, com pólos norte e sul. Isto é algo que decorre de um somatório de dipolos magnéticos intrínsecos devidos ao spin do elétron, pois este movimento cria um dipolo magnético próprio.
- **Diamagnetismo:** é caracterizado pelo fato dos átomos ou moléculas não produzirem um momento magnético resultante. Os momentos magnéticos dos elétrons no

interior de cada um dos átomos se anulam, de modo que o momento magnético resultante é zero.

- **Paramagnetismo:** os materiais paramagnéticos são materiais cujos átomos possuem momentos de dipolo magnético permanentes. Na ausência de campo aplicado, os momentos de dipolo estão inicialmente orientados no espaço, portanto, a magnetização resultante é zero. Quando um campo magnético externo é aplicado ao material, os dipolos tendem a alinhar-se com o campo.
- **Ferromagnetismo:** os materiais ferromagnéticos apresentam uma forte interação entre os dipolos magnéticos vizinhos, um alto grau de alinhamento ocorre mesmo em campos magnéticos fracos, o que causa um aumento muito elevado no campo total. Mesmo quando não há um campo magnético externo um material ferromagnético pode ter seus dipolos magnéticos alinhados, assim como em um ímã permanente.
- **SQUID:** dispositivos supercondutores de interferência quântica, em inglês *Superconducting Quantum Interference Device*, é um dispositivo usado para mensurar campos magnéticos extremamente baixos.

RESUMO

A transmissão autóctone da esquistossomose no município de Esteio, Rio Grande do Sul foi confirmada pela primeira vez em 1998, constituindo o foco mais meridional das Américas. Embora não tenham sido detectadas diferenças morfológicas do parasito em estudo prévio, a abordagem das características biológicas neste trabalho evidenciou algumas peculiaridades, tais como a baixa infectividade do miracídios e a alta taxa de infecção unissexual por machos, que podem ter importância para uma melhor compreensão da dinâmica de transmissão no foco de Esteio e adequação das medidas de controle. O estudo epidemiológico do foco conduziu ao desenvolvimento de um método de diagnóstico, Helmintex, mais sensível que os métodos coprológicos clássicos para detectar o baixo número de ovos eliminados nas fezes dos pacientes. O método utiliza a interação magnética com microesferas paramagnéticas para o isolamento dos ovos. O mecanismo de interação dos ovos com o campo magnético poderia estar relacionado com a presença de ferro na casca do ovo. O *Schistosoma mansoni* ingere grande quantidade de sangue e necessita de rota metabólica especializada para eliminação do ferro. O objetivo do trabalho foi investigar a presença de ferro na casca do ovo por análise por espectroscopia por dispersão de energia. Os resultados possibilitaram a identificação do elemento químico ferro presente no ovo, além de pequenas estruturas cristalinas, provavelmente magnetita. A presença de estruturas com propriedades magnéticas suscetíveis de magnetização foram motivo para caracterização magnética dos ovos de *Schistosoma* com o encontro de comportamento ferromagnético e paramagnético. Também foram analisados ovos de outros helmintos para verificar se diferenças composicionais dos ovos estavam associadas a diferentes grupos taxonômicos e tipos de habitat. Os achados estimulam novas investigações sobre a rota metabólica envolvendo o ferro, desenvolvimento de novas modalidades de tratamento e recursos diagnósticos.

ABSTRACT

The autochthonous transmission of schistosomiasis in Rio Grande do Sul was confirmed for the first time in 1998, establishing the southernmost focus in Americas. Although no morphological differences were detected in a previous study, the investigation of biological characteristics of the parasite in the current study showed some peculiarities that may be relevant for a better understanding of transmission dynamics in the Esteio focus and adequacy of control measures. The epidemiological study of this focus led to the development of a diagnostic method, Helmintex, more sensitive than the traditional methods for detecting small number of eggs shed in the patients' feces. In this method eggs are isolated through magnetic interaction with paramagnetic beads and this mechanism could be related to the presence of iron in the eggshell. *Schistosoma mansoni* worms ingest large amounts of blood and requires specialized metabolic pathway for iron elimination. When analyzed by energy dispersive spectroscopy iron and small crystal structures probably magnetite were identified in the eggshell. The presence of structures with potentially magnetizing properties led to the magnetic characterization of *Schistosoma* eggs and demonstration of ferromagnetic and paramagnetic behavior. Eggs were also analyzed to see if other helminth eggs compositional differences were related to different taxonomic groups and habitat types. These findings stimulate further research on the metabolic pathway involving iron, development of new treatment modalities and diagnostic tools.

APRESENTAÇÃO

A esquistossomose é uma doença parasitária provocada por helmintos do gênero *Schistosoma*, que têm como hospedeiros intermediários caramujos de água doce, e que podem evoluir desde formas assintomáticas até formas clínicas extremamente graves.

A presença do parasito foi relatada em 1998 no município de Esteio-RS dando início a diversos inquéritos epidemiológicos e a tentativa de erradicação do foco de transmissão. Com o andamento da investigação foi documentada a presença de um baixo número de ovos do parasito nas fezes com muitas amostras fecais apresentando menos de 1 ovo por grama. Esse encontro estimulou o estudo das características biológicas do parasito para melhor se compreender sua biologia em um foco de recente introdução. Os dados estão relatados no capítulo 1 desta tese.

A necessidade de um método mais sensível que se adaptasse à realidade da transmissão no foco de Esteio evoluiu para o desenvolvimento de um método utilizando microesferas paramagnéticas em um campo magnético. O mecanismo de ação do método era desconhecido e partiu-se para desvendar essa questão.

A presença de ferro na casca do ovo do parasito poderia ser o motivo desse comportamento magnético. Através da microanálise foi possível identificar a presença desse metal na casca e, mais ainda, a presença de pequenas estruturas cristalinas com grande quantidade de átomos de ferro e oxigênio, sugerindo a presença de magnetita. Analisaram-se também, ovos de helmintos de grupos taxonômicos diferentes com diferentes locais de parasitismo. O capítulo 2 aborda os dados referentes à identificação dos elementos químicos presentes na casca dos ovos.

A primeira caracterização magnética feita nos ovos de *S. mansoni* e *S. japonicum* resultou no achado de componentes ferromagnéticos e paramagnéticos com grande suscetibilidade à magnetização. O capítulo 3 relata os resultados da caracterização magnética dos ovos de *S. japonicum* e *S. mansoni*.

As normas da revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz foram seguidas para formatação dos artigos. Contudo, os capítulos foram escritos em português e após a correção dos avaliadores serão traduzidos para o inglês e as figuras e tabelas foram colocadas ao longo do texto a fim de facilitar a leitura do documento.

CAPÍTULO 1

Características biológicas da cepa Esteio de *Schistosoma mansoni* em infecção experimental de camundongos e moluscos do gênero *Biomphalaria*

Rafael Lucyk Maurer¹, Carlos Graeff-Teixeira

¹ Laboratório de Biologia Parasitária, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Avenida Ipiranga 6681, Prédio 12, Bloco C, Sala 239. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil, CEP 90619-900.

Correio eletrônico: maurer.rafael@gmail.com

RESUMO

A transmissão autóctone da esquistossomose no Rio Grande do Sul foi confirmada pela primeira vez no município de Esteio no ano de 1998, constituindo o foco mais meridional das Américas. A partir daquela data, vários trabalhos foram desenvolvidos para caracterizar epidemiologicamente este foco de transmissão de baixa endemicidade e de recente introdução. O objetivo desse trabalho foi descrever os caracteres biológicos do isolado Esteio através da análise das taxas de infectividade, mortalidade de caramujos, período pré-patente dos hospedeiros, oviposição e a relação macho/fêmea na infecção experimental em camundongos. Como hospedeiros experimentais foram utilizados *Biomphalaria* spp. simpátrica e camundongos *Mus musculus*. *Biomphalaria* spp. infectadas com 2 miracídios apresentaram diferença significativa na infectividade em relação aos grupos infectados com 4, 8 e 10 miracídios, entre esses 3 grupos não houve diferença estatística. Camundongos infectados com 50 e 100 cercárias, respectivamente, não apresentaram diferenças no período pré-patente, infectividade, produção de ovos e relação macho:fêmea. Detectou-se uma alta taxa de infecção unissexual por machos

a uma relação de 5,8:1 e 6,3:1. O conhecimento dos caracteres biológicos do parasito é importante para a adequação do ciclo parasitário em laboratório e contribui para melhorar o conhecimento da biologia do foco em questão visando meios para sua eliminação.

Palavras-chaves: *Schistosoma mansoni*, cepas, baixa endemicidade, recente introdução, Rio Grande do Sul, Brasil.

INTRODUÇÃO

A esquistossomose mansônica é uma endemia encontrada em 54 países distribuídos na África, Península Arábica, América do Sul e Ilhas do Caribe (Chitsulo et al. 2000). Evidências apontam para uma origem asiática do parasito dispersando para África e, posteriormente, outros países (Lawton et al. 2011).

Durante esse processo de expansão o parasito foi se adaptando ao meio ambiente, de acordo com a presença do seu hospedeiro intermediário e se instalando em novas regiões. A introdução da esquistossomose na América se deu em meados do século XVI, com o tráfico de escravos africanos na região Nordeste e Sudeste (Després et al. 1993; Coura & Amaral 2004). Associado com as migrações internas, a parasitose e seu hospedeiro intermediário se espalharam pelo país (Coura & Amaral 2004).

No Brasil a esquistossomose encontra-se distribuída principalmente nas regiões Sudeste e Nordeste. Com focos de transmissão isolados em outros estados (Coura & Amaral 2004). Em 1997 foi descoberto um caso de esquistossomose, posteriormente confirmado como autóctone no Estado do Rio Grande do Sul (RS), no município de Esteio, região metropolitana de Porto Alegre. Com isso o RS passou a ter o foco mais meridional de transmissão das Américas (Graeff-Teixeira et al.

1999). Na mesma época, foi descoberta a presença da *Biomphalaria glabrata* no foco de transmissão, até então ausente dos relatos de levantamento planorbídico no Rio Grande do Sul (Neto 1972; Teles et al. 1991). Juntamente foi relatada a presença de *B. tenagophila guaibensis* e *B. occidentalis*, embora os moluscos coletados não apresentassem positividade para *S. mansoni* (Carvalho et al. 1998).

Em áreas de recente introdução a baixa prevalência e o baixo número de ovos são esperados (Mouchet et al. 1988). Diferentemente do encontrado na bibliografia, o foco de transmissão de Esteio apresenta o número de ovos por grama de fezes extremamente baixo, muitas vezes com menos de 1 ovo por grama, dificultando o diagnóstico (Graeff-Teixeira et al. 2004).

A expansão geográfica da esquistossomose e a estrutura populacional do parasito podem influenciar na dinâmica da transmissão, preferência pelo hospedeiro e sua patogenicidade (Bastos et al. 1978; Lemos Neto et al. 1978; Machado-Silva et al. 2003; Blank et al. 2009). O estudo das cepas do *S. mansoni* resultou na descrição de diferentes características biológicas (Martinez et al. 2003), morfológicas (Neves et al. 1998; Machado-Silva et al. 2000; Machado-Silva et al. 2003) e genéticas (Agola et al. 2009; Curtis et al. 2002), resistência aos medicamentos (Dias et al. 1988a) e infectividade em hospedeiros intermediários e definitivos experimentais (Dias et al. 1987, 1988b; Souza et al. 1996; Bin Dajem et al. 2008).

Relatos sobre a descrição dos parâmetros biológicos do *S. mansoni* em focos de introdução recente são escassos. Dentre esses, são mais frequentes as análises de prevalência de pacientes e moluscos infectados e o número de ovos por grama de fezes (Vimont Vicary 1981; Guerra et al. 1991), além da taxa de infecção em hospedeiros e sua patogenia em humanos (Paraense et al. 1984; Moyou-Somo

et al. 2003), entretanto os autores não abordaram aspectos da biologia do parasito desses focos em uma análise experimental.

O objetivo do presente trabalho é a descrição de caracteres biológicos do *S. mansoni* isolado Esteio em camundongos *Mus musculus* da linhagem Swiss e *Biomphalaria* spp. simpátricas do respectivo foco.

MATERIAIS E MÉTODOS

Cepa Esteio: O município de Esteio (aproximadamente 29°50' S para 29°54' S e 51°12' para 51°10' W) está localizado a 15 quilômetros de Porto Alegre, capital do estado. O parasito foi isolado do foco de transmissão a partir de fezes humanas e caramujos naturalmente infectados. Na manutenção em laboratório utiliza-se *Biomphalaria* spp. e camundongos Swiss.

Moluscos: Progenies de *Biomphalaria* spp. coletadas em Esteio são mantidos em laboratório em aquários com água decolorada, temperatura de 24°C ± 1°C alimentados com alface fresca. Miracídios utilizados na infecção foram obtidos pelo Método de Chaia em câmara climática a uma temperatura de 28°C e luz artificial (Chaia et al. 1968). Os miracídios foram separados e colocados em placas de Petri com 5 mL de água decolorada junto com o molusco por 8-12 horas. Os moluscos utilizados possuíam um diâmetro de concha variando de 5 mm a 7 mm. Utilizaram-se 43 moluscos para a infecção com 2 miracídios cada, 44 moluscos com 4 miracídios, 24 moluscos com 8 miracídios e 10 moluscos com 10 miracídios. Entre 25 e 70 dias após a infecção os caramujos foram expostos à luz artificial a uma temperatura de 28°C por no mínimo 3 horas para verificação da taxa de infecção, período pré-cercariano (PPC) em dias; todas as cercárias eliminadas foram

homogeneizadas em um frasco, para a infecção dos camundongos. A taxa mortalidade dos moluscos infectados foi observada ao longo do experimento.

Roedores: Camundongos machos de 45-60 dias de idade provenientes do biotério da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde-RS (FEPPS-RS), foram mantidos em 5 animais por caixa, com ciclo claro/escuro de 12h, temperatura de $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, água e comida *ad libitum*. Foram infectados dois grupos de 15 e 12 camundongos, via subcutânea, com 50 e 100 cercárias, respectivamente. Entre 25 e 54 dias após a infecção, fezes de 24 horas foram coletadas, pesadas e processadas pelo método de Kato-Katz (KK) (Katz et al. 1972), tendo sido elaboradas duas lâminas para cada animal. Avaliou-se o PPP e o número de ovos por grama de fezes (OPG). Após 54 dias decorridos da infecção os animais foram sacrificados por depressão respiratória induzida por dióxido de carbono, perfundidos com solução salina citratada a 0,9% e necropsiados (Smithers & Terry 1965) avaliando-se a taxa de infectividade, número de vermes encontrados e a relação de macho e fêmea. Os experimentos realizados estão de acordo com as normas estabelecidas pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da PUCRS.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise dos dados utilizou-se os testes de Mann-Whitney, Regressão Logística e Teste *t* de Student com o auxílio do programa SPSS® 16.0. Valores com $p \leq 0,05$ foram considerados significativos.

RESULTADOS

Os dados referentes à infecção dos moluscos estão resumidos na tabela 1. No grupo de infecção com 2 miracídios apenas 1 espécime eliminou cercárias, no grupo com 4 miracídios, 10 caramujos eliminaram cercárias e todos morreram após um período que variou de 63 a 218 dias pós-infecção. Dos grupos com 8 e 10 miracídios foram infectados 24 e 10 caramujos, respectivamente. Com 8 miracídios apenas 7 caramujos eliminaram cercárias e 4 morreram, já no grupo com 10 miracídios houveram 2 mortes e 3 caramujos eliminaram cercárias. A utilização de 4, 8 e 10 miracídios elevou em 12%, 17% e 18%, respectivamente, a chance de o caramujo se infectar quando comparado com o grupo de 2 miracídios e não apresentou diferença significativa entre os grupos infectados com 4, 8 e 10 miracídios. Associado a esse resultado houve uma diminuição na taxa de mortalidade e do período pré-cercariano na medida em que aumentava o número de miracídios utilizados.

Tabela 1- Infectividade dos miracídios, mortalidade do moluscos e período pré-cercariano da cepa Esteio frente a *Biomphalaria* spp. simpátricas.

Miracídios (n)	N°. de moluscos (positivos)	Taxa de infecção (%)	Mortalidade (%)	PPC*
2	43 (1)	2,3 ^a	41,9 ^b	68
4	44 (10)	22,7 ^b	27,3 ^b	46
8	24 (7)	29,2 ^b	16,7 ^b	43
10	10 (3)	30 ^b	20 ^b	36

*: período pré-cercariano, média de dias.

a: p=0,01

b: p>0,05

Dos camundongos infectados com 50 cercárias, 8 apresentavam casais, 5 somente machos e 2 não estavam infectados. No grupo infectado com 100 cercárias 2 apresentavam casais, 6 somente machos e 4 não estavam infectados. A tabela 2 demonstra os dados da infectividade das cercárias. Pelo teste de Regressão Logística não houve diferença significativa entre o número de cercárias utilizadas e o número de vermes achados ($p=0,457$).

Tabela 2- Infectividade das cercárias da cepa Esteio em camundongos Swiss.

Camundongos (n)	Cercárias (n)	Taxa de infecção(%)	Vermes recuperados		
			Machos (n)	Fêmeas (n)	Relação macho:fêmea
15	50	14,5	93	16	5,8:1
12	100	5,5	57	9	6,3:1

A eliminação de ovos nas fezes iniciou-se a partir do 45° dia de infecção e foi acompanhada até o dia da eutanásia, no 54° dia após a infecção. O período pré-patente observado nos grupos não apresentou diferença significativa. O número médio de ovos encontrados nas lâminas de KK foi de 3 e 2,8 para os roedores infectados com 50 e 100 larvas, respectivamente, o resultado é apresentado na tabela 3.

Tabela 3- Número de ovos de eliminados pelos camundongos experimentalmente infectados com cercárias da cepa Esteio.

Camundongos (n)	Cercárias (n)	OPG* (n)	Total de ovos (n)	PPP (dias)
15	50	81	2692	45
12	100	68	2490	46

*: média diária

No gráfico 1 pode-se observar a cinética da eliminação dos ovos a partir do 45º dia.

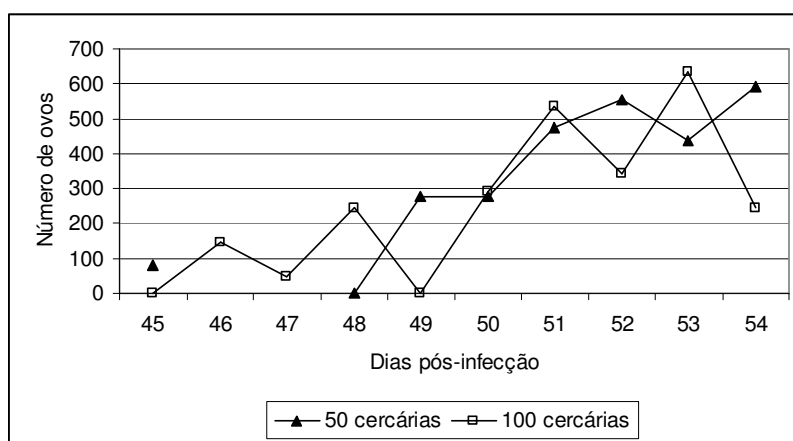


Figura 1- Eliminação diária dos ovos entre 45 e 54 dias pós-infecção com 50 e 100 cercárias, na infecção experimental de camundongos com *S. mansoni* de Esteio-RS.

DISCUSSÃO

Vários estudos relataram as diferenças de infectividade para os moluscos hospedeiros do *S. mansoni* bem como a adaptação ao hospedeiro definitivo (Bastos et al. 1978; Dias et al. 1987; Martinez et al. 2003). Estas variações já descritas são

importantes para o entendimento da relação parasito-hospedeiro e na epidemiologia da doença.

Na região de transmissão da esquistossomose em Esteio foram descritas três espécies de moluscos transmissores, todavia nenhuma se apresentou infectada (Carvalho et al. 1998). No presente estudo coletaram-se moluscos de dois locais com presença confirmada de *B. glabrata* para implantação da colônia e manutenção do ciclo (Graeff-Teixeira et al. 2004).

Em relatos na literatura verificou-se uma alta taxa de infectividade em moluscos simpátricos da Venezuela com cepas do mesmo país do parasito, alcançando índices de até 67,8% (Matinella et al. 2000), assim como em outro estudo realizado na Venezuela onde as taxas de infecção variaram de 62,5% a 87,5% (Pino et al. 1999). Com cepas brasileiras, a taxa de infectividade variou de 57% para uma cepa isolada de humanos a 76% para a cepa isolada de roedores naturalmente infectados (Freire et al. 2003). Em relato publicado por Zanotti-Magalhães et al. 1997 onde utilizaram moluscos selecionados ou não selecionados geneticamente para o caráter susceptibilidade à miracídios obteve-se uma taxa de 44% de infectividade para os miracídios e moluscos simpátricos não selecionados. Em outros estudos para verificação da compatibilidade de infecção em moluscos simpátricos com cepas alopátricas o nível de infectividade dos miracídios variou de 0% a 22% (Dias et al. 1987; Incani 1993).

A taxa de infectividade dos miracídios permaneceu praticamente constante nos grupos analisados, exceto no grupo infectado com 2 miracídios (2,3%) onde houve diferença significativa quando comparado aos outros grupos que apresentaram uma taxa variando de 22,7% a 30% sugerindo o início de uma adaptação entre o parasito e o molusco local devido ao efeito da recente introdução.

O aumento do número de miracídios utilizados fornece uma maior variabilidade genética do parasito frente ao hospedeiro (Matinella et al. 2000) aumentando a possibilidade do encontro de alelos combinantes para o caráter susceptibilidade a infecção do molusco e, possivelmente, diminuindo a virulência do parasito e aumentando a infectividade (Webster & Woolhouse 1998; Webster et al 2004). Conforme encontrado no presente estudo observou-se um aumento da positividade dos moluscos e a diminuição do período pré-cercariano quando aumentado o número de miracídios por moluscos.

A proporção de machos e fêmeas encontrados está de acordo com dados que afirmam que miracídios e cercárias machos apresentam uma maior infectividade (Liberatos 1987; Boissier et al. 1999). Biologicamente, o maior número de vermes machos pode estar relacionado com a tendência de que mais machos representaria um aumento da competição e variabilidade entre os indivíduos do mesmo sexo permitindo uma maior seletividade por parte das fêmeas (Beltran & Boissier 2009). Corroborando com nossos experimentos onde foram encontradas infecções unissexuais, 33% para o grupo infectado com 50 cercárias e 50% para o grupo de 100 cercárias.

O número de ovos eliminados e o período pré-patente pelos dois grupos não apresentou diferença significativa apesar de o grupo infectado com 50 cercárias ter apresentado 16 casais e o grupo de 100 cercárias apresentado 9 casais. Por outro lado, quando se considera a média diária de ovos por fêmea, foram contados 168 e 276 ovos, respectivamente para os grupos de 50 e 100 cercárias. Estima-se que uma fêmea produza aproximadamente 350 ovos por dia (Dewalick et al. 2011). Porém, em nosso trabalho, os dados foram obtidos apenas para o período de 10 dias pós-infecção e a produção de ovos varia em diferentes tempos de infecção: é

menor no início, aumenta progressivamente entre 49 e 72 dias pós-infecção e reduz-se novamente após esta etapa (Martinez et al. 2003). Desta forma, não cabe fazer inferências sobre diferença biológica de cepas de outras regiões a partir dos nossos resultados de média diária de ovos por fêmea.

Estudos da dinâmica de transmissão podem ser feitos por modelagem matemática onde os detalhes da biologia do parasito podem ser importantes para calibrar o modelo. Teoricamente existe um limiar de intensidade de transmissão abaixo do qual ocorreria uma tendência à extinção espontânea da transmissão ou pelo menos a estabilização em níveis muito baixos (Macdonald 1965).

O melhor conhecimento das características biológicas contribui para uma melhor compreensão da dinâmica de transmissão e ajuste das medidas de controle, que neste caso são orientadas para eliminação da transmissão (Passos 1998). Além disto, este melhor conhecimento permite aprimorar as condições de manutenção do parasito em laboratório para estudos experimentais e elucidação da biologia do parasito e sua interação com os hospedeiros.

AGRADECIMENTOS

À técnica Priscilla Sundin e aos estudantes de Iniciação Científica Carla Müller, Ivonilda Machado e à mestranda Carolina Veríssimo pelo auxílio na manutenção do ciclo e acompanhamento dos experimentos. Ao CNPq pela bolsa concedida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agola LE, Steinauer ML, Mburu DN, Mungai BN, Mwangi IN, Magoma GN, Loker ES, Mkoji GM 2009. Genetic diversity and population structure of *Schistosoma mansoni* within human infrapopulations in Mwea, central Kenya assessed by microsatellite markers. *Acta Tropica*, 111, 219-225.

Bastos OC, Magalhães LA, Rangel HA, Piedrabuena AE 1978. Alguns dados sobre o comportamento parasitológico das linhagens humana e silvestre do *Schistosoma mansoni*, no Vale do Rio Paraíba do Sul, SP (Brasil). *Revista de Saúde Pública*, 12, 184-199.

Beltran S, Boissier J 2009. Male-biased sex ratio: why and what consequences for the genus *Schistosoma*? *Trends in Parasitology*, 26, 63-69

Bin Dajem SM, Mostafa OM, El-Said FG 2008. Susceptibility of two strains of mice to the infection with *Schistosoma mansoni*: parasitological and biochemical studies. *Parasitology Research*, 103, 1059-1063.

Blank WA, Reis EA, Thiong'o FW, Braghiroli JF, Santos JM, Melo PR, Guimaraes IC, Silva LK, Carmo TM, Reis MG, Blanton RE 2009. Analysis of *Schistosoma mansoni* population structure using total fecal egg sampling. *The Journal of Parasitology*, 95, 881-889.

Boissier J, Morand S, Moné H 1999. A review of performance and pathogenicity of male and female *Schistosoma mansoni* during the life-cycle. *Parasitology*, 119, 447-454.

Carvalho OS, Nunes IM, Caldeira RL 1998. First report of *Biomphalaria glabrata* in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 93, 39-40.

Chaia G, Chaia AB, McAullife J, Katz N, Gasper D 1968. Coprological diagnosis of schistosomiasis. II. Comparative study of quantitative methods. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 10, 349-353.

Chitsulo L, Engels D, Montresor A, Savioli L 2000. The global status of schistosomiasis and its control. *Acta Tropica*, 77, 41-51.

Coura JR, Amaral RS 2004. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic areas. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99, 13-19.

Curtis J, Sorensen RE, Minchella DJ 2002. Schistosome genetic diversity: the implications of population structure as detected with microsatellite markers. *Parasitology*, 125, S51-59.

Després L, Imbert-Establet D, Monnerot M 1993. Molecular characterization of mitochondrial DNA provides evidence for the recent introduction of *Schistosoma mansoni* into America. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 60, 221-229.

Dewalick S, Tielens AG, van Hellemond JJ 2011. *Schistosoma mansoni*: The egg, biosynthesis of the shell and interaction with the host. *Experimental Parasitology*.

Dias LC, Bruce JI, Coles GC 1988a. Variation in response of *Schistosoma mansoni* strains to schistosomicides. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 30, 81-85.

Dias LC, Bruce JI, Coles GC 1988b. Strain variation in the infectivity of *Schistosoma mansoni* for *Biomphalaria glabrata*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 30, 86-90.

Dias LC, Ueta MT, Guaraldo AMA 1987. Suscetibilidade de *Biomphalaria glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila* a diferentes cepas de *Schistosoma mansoni*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 29, 205-212.

Freire N, Rodrigues-Silva R, Machado-Silva JR, Rey L 2003. A comparative parasitologic study on *Biomphalaria glabrata* snail and C3H/He mice infected with human and murine isolates of *Schistosoma mansoni* derived from Sumidouro, Rio de Janeiro, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98, 783-787.

Graeff-Teixeira C, Anjos CB, Oliveira VC, Velloso CFP, Fonseca MBS, Valar C, Moraes C, Garrido CT, Amaral RS 1999. Identification of a Transmission Focus of *Schistosoma mansoni* in the Southernmost Brazilian State, Rio Grande do Sul. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94, 9-10.

Graeff-Teixeira C, Valar C, Moraes CKD, Salvany AM, Brum CDO, Maurer RL, Ben R, Mardini LBLF, Jobim MB, Amaral RSD 2004. The initial epidemiological studies in the low endemicity schistosomiasis area in Esteio, Rio Grande do Sul, the southernmost Brazilian state, 1997 to 2000. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99, 73-78.

Guerra HL, Guimaraes CT, Franca MA, Rocha RS, Katz N 1991. Identification of a new focus of *Schistosoma mansoni* (Municipality of Nova Lima, MG, Brazil). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 24, 169-172.

Incani RN 1993. Compatibility of one Brazilian and two Venezuelan strains of *Schistosoma mansoni* with various strains of *Biomphalaria glabrata*. *Parasitology Research*, 79, 508-511.

Katz N, Chaves A, Pellegrino J 1972. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in Schistosomiasis mansoni. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 14, 397-400.

Lawton SP, Hirai H, Ironside JE, Johnston DA, Rollinson D 2011. Genomes and geography: genomic insights into the evolution and phylogeography of the genus *Schistosoma*. *Parasites & Vectors*, 4, 131.

Lemos Neto RC, Magalhães LA, Piedrabuena AE 1978. Alguns aspectos referentes ao estudo de linhagens de *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907, provenientes dos

Estados de Minas Gerais e de São Paulo, Brasil. *Revista de Saúde Pública*, 12, 277-290.

Liberatos JD 1987. *Schistosoma mansoni*: Male-biased sex ratios in snails and mice. *Experimental Parasitology*, 64, 165-177.

Macdonald G 1965. The dynamics of helminth infections, with special reference to schistosomes. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 59, 489-506.

Machado-Silva JR, da Silva CH, Pereira MJ, de Oliveira RM, Pinto RM, Gomes DC 2000. Differences in Brazilian strains of *Schistosoma mansoni* evaluated by means of morphometric analysis of cercariae of both sexes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 95, 839-842.

Machado-Silva JR, Neves RH, Ormond L, Hulstijn M, Gomes DC 2003. Caracterização de cepas de *Schistosoma mansoni* por morfometria de vermes adultos provenientes de infecção unissexual. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36, 755-757.

Martinez EM, Neves RH, Oliveira RMF, Machado-Silva JR, Rey L 2003. Características biológicas e morfológicas de cepas brasileiras de *Schistosoma mansoni* em *Mus musculus*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36, 557-564.

Matinella L, Pino L, Morales G 2000. Relación hospedador - parásito entre tres cepas de *Schistosoma mansoni* y seis cepas de *Biomphalaria glabrata* de áreas endémicas y no endémicas venezolanas. *Boletín Chileno de Parasitología*, 55, 1-8.

Mouchet F, Develoux M, Balla Magassa M, Sellin B 1988. Etude epidemiologique du foyer a *Schistosoma mansoni* de Bana (Niger). *Medecine Tropicale*, 48, 209-213.

Moyou-Somo R, Kouemeni LE, Ndjamen B, Ngogang J, Dongla R, Longang-Tchatchouang V, Hassimi M 2003. A new focus of *Schistosoma mansoni* in Yoro village, Mbam and Inoubou Division, Cameroon. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 69, 74-77.

Neto AGC 1972. *Biomphalaria straminea* em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. *Atas da Sociedade de Biologia do Rio de Janeiro*, 15, 151.

Neves RH, Pereira MJ, de Oliveira RM, Gomes DC, Machado-Silva JR 1998. *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907: morphometric differences between adult worms from sympatric rodent and human isolates. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 93, 309-312.

Paraense WL, de Souza PE, Braun RF 1984. New foci of transmission of *Schistosoma mansoni* in the state of Pará. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 79, 389-391.

Passos ADC 1998. Controle da esquistosomose: diretrizes técnicas. In, 2 ed., Fundação Nacional de Saúde: Ministério da Saúde, p. 70p.

Pino LA, Matinella L, Morales C. G 1999. Compatibilidad entre nueve cepas de *Biomphalaria glabrata* de áreas endémicas y no endémicas y una cepa de *Schistosoma mansoni* venezolanas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 32, 677-682.

Smithers SR, Terry RJ 1965. The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of the adult worms. *Parasitology*, 55, 695-700.

Souza CP, Jannotti-Passos LK, Ferreira SS, Vieira IBF 1996. *Schistosoma mansoni*: the sex ratios of worms in animals infected with cercariae from three species of *Biomphalaria*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 38, 141-145.

Teles HMS, Pereira PAC, Richinitti LMZ 1991. Distribuição de *Biomphalaria* (Gastropoda, Planorbidae) nos Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, Brasil. *Revista de Saúde Pública*, 25, 350-352.

Vimont Vicary MP 1981. Recent detection of a schistosomiasis focus with *S. mansoni* in a high region of Rwanda. *Medecine Tropicale*, 41, 653-656.

Webster JP, Woolhouse MEJ 1998. Selection and strain specificity of compatibility between snail intermediate hosts and their parasitic schistosomes. *Evolution*, 52, 1627-1634.

Webster JP, Gower CM, Blair L 2004. Do hosts and parasites coevolve? Empirical Support from the *Schistosoma* system. *The American Naturalist*, 164, S33-S51.

Zanotti-Magalhães EM, Magalhães LA, Carvalho JF 1997. Relação entre patogenicidade do *Schistosoma mansoni* em camundongos e susceptibilidade do molusco vetor. IV - Infeciosidade dos miracidios. *Revista de Saúde Pública*, 31, 488-494.

CAPÍTULO 2

Identificação de elementos químicos potencialmente suscetíveis de magnetização presentes na casca do ovo de *Schistosoma mansoni*

Rafael Lucyk Maurer¹, Malcolm Jones, Carlos Graeff-Teixeira

¹ Laboratório de Biologia Parasitária, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Avenida Ipiranga 6681, Prédio 12, Bloco C, Sala 239. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil, CEP 90619-900.

Correio eletrônico: maurer.rafael@gmail.com

RESUMO

O diagnóstico da esquistossomose em áreas de baixa endemicidade pelos métodos coprológicos resultam em muitos resultados falsos-negativo. Um método de diagnóstico utilizando a interação magnética como fator de isolamento de ovos nas fezes em zonas de baixa endemicidade permitiu uma maior sensibilidade para o diagnóstico. Este estudo objetiva identificar elementos químicos na casca do ovo de *S. mansoni*, que possam estar envolvidos no mecanismo do método de separação magnética previamente descrito, Helmintex. Também foram analisados ovos de outros helmintos: *Ascaris lumbricoides*, *Haemonchus contortus*, *Fasciola gigantica*, *Fascioloides magna* para avaliar diferenças de composição química que pudessem estar relacionadas à diversidade de grupos taxonômicos ou tipo de habitat. Os ovos foram desidratados e processados para microscopia eletrônica de varredura e transmissão. A espectroscopia por dispersão de energia foi capaz de identificar elementos com propriedades magnéticas suscetíveis de magnetização formadas provavelmente por biomineralização. Esses achados contribuem para compreensão

do mecanismo do Helmintex e estimulam novos estudos sobre a biologia do parasito e a relação parasito-hospedeiro-habitat.

Palavras-chave: *Schistosoma mansoni*, ferro, Trematoda, Nematoda, espectroscopia por dispersão de energia.

INTRODUÇÃO

A esquistossomose é infecção parasitária causada por trematódeos do gênero *Schistosoma*. Aproximadamente 200 milhões de pessoas estão infectadas e distribuídas por 74 países (Chitsulo et al. 2004). O *S. mansoni*, parasito das veias mesentéricas, é o único representante do gênero no Brasil e possui sua distribuição geográfica associada com a presença do molusco hospedeiro (Coura & Amaral 2004; Gryseels et al. 2006).

As fêmeas depositam seus ovos na corrente sanguínea sendo eliminados junto com as fezes no ambiente. Em estudos epidemiológicos o diagnóstico através do método Kato-Katz (KK) é amplamente usado devido a suas facilidades operacionais, sendo o método recomendado pela Organização Mundial da Saúde (Chitsulo et al. 2000). Entretanto, relatos indicam uma possível deficiência desse exame em áreas de baixa endemicidade acarretando muitos resultados falso-negativos (Barreto et al. 1990; Engels et al. 1996; Kongs et al. 2001).

Com intuito de aumentar a sensibilidade do exame coprológico para esquistossomose mansônica em zonas de baixa endemicidade foi desenvolvido um método, chamado Helmintex, baseado na interação dos ovos do parasito com partículas superparamagnéticas em campo magnético (Teixeira et al. 2007).

O mecanismo de separação magnética para os ovos de *S. mansoni* é desconhecido e pode estar associado à presença de ferro na casca do ovo, como descrito para o *S. japonicum* (Jones et al. 2007).

O processo de formação da casca do ovo dos parasitos é diferente para platelmintos e nematódeos (Ray Gamble et al. 1995) e poderia ser influenciado pelos hábitos alimentares do verme, habitat além de peculiaridades metabólicas de cada espécie. Dessa forma surgiu a ideia de analisar os ovos de parasitos provenientes de diferentes grupos taxômicos, habitat e hábito alimentar. O objetivo do presente trabalho é investigar a composição da casca ovo desses parasitos e contribuir para a compreensão do mecanismo do método Helmintex. Para tanto, foi escolhido um nematódeo intestinal, *Ascaris lumbricoides* e um hematófago de interesse veterinário, *Haemonchus contortus*. Para os trematódeos foram selecionados a *Fasciola gigantica*, parasito dos ductos biliares, *Fascioloides magna*, parasito encontrado em pseudocistos no fígado de cervídeos e o hematófago *Schistosoma mansoni* encontrado no sistema porta-hepático.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta dos ovos

Amostras fecais contendo ovos de *A. lumbricoides* e *F. gigantica* foram gentilmente cedidos por Catherine Gordon, *Queensland Institute of Medical Research*. Os ovos de *F. magna* foram doados por Martin Kasny, *Charles University-Prague* e os ovos de *H. contortus* foram cedidos por Ranbir Sarai, *The University of Queensland*.

Ovos de *Ascaris lumbricoides* foram separados a partir de fezes humanas utilizando a técnica FLOTAC (Cringoli et al. 2010). Resumidamente, o método utiliza um aparato (aparato FLOTAC) colocado em uma centrífuga permitindo a flutuação de ovos. Após, o material contendo os ovos foi colocado em tubos de 50 mL para sedimentar.

Fezes de búfalos contendo ovos de *Fasciola gigantica* foram maceradas, sedimentadas e filtradas em filtros de nylon com 250 µm de abertura e sedimentados em tubos de 50 mL.

Ovos de *Fascioloides magna* foram obtidos a partir de pseudocistos hepáticos de cervos. Os ovos foram removidos dos pseudocistos, lavados em água destilada e concentrados por decantação.

Ovos de *Haemonchus contortus* provenientes de fezes de carneiro foram isolados a partir de decantação, tamisação em peneira com filtro de 250 µm de abertura. Após tamisação e decantação, os ovos foram centrifugados (Centrífuga 5702R, Eppendorf, Alemanha) num gradiente de sacarose a 10 e 25% a 2000 RPM por 7 minutos em tubos de 50 mL. Os ovos formaram uma pequena película branca entre os dois gradientes.

A cepa Porto Rico de *Schistosoma mansoni* é mantida em camundongos Swiss e moluscos *Biomphalaria glabrata*. O ciclo vital do parasito é mantido no *Queensland Institute of Medical Research – QIMR*. Os ovos foram obtidos a partir de fezes e fígados de camundongos infectados. Fezes de 24 horas foram coletadas das caixas dos roedores, maceradas em tubo de 50 mL e tamisadas em filtros de 250 µm e 40 µm de abertura, respectivamente. Os ovos permaneceram no filtro de 40 µm.

Os ovos isolados do fígado foram extraídos após digestão em colagenase B (Roche) e gradiente de Percoll (Sigma), lavados em tampão salino fosfatado contendo 1 mM EDTA (Sigma) e EGTA (Sigma) para interromper a atividade da enzima e quelar o ferro livre, segundo protocolo de Dalton et al. (1997).

Todos os ovos foram coletados utilizando uma micropipeta com auxílio do microscópio invertido Axiovert 40 (Zeiss, Alemanha), lavados em água Milli-Q e armazenados em microtubos de polipropileno de 500 µL em etanol 70°.

Preparação dos ovos

Os ovos coletados foram desidratados primeiramente em série crescente de etanol e após com hexametildissilazana (HMDS, Sigma) com auxílio de forno de microondas Pelco 34700 Biowave (Ted Pella Inc., EUA) e deixados secar à temperatura ambiente em capela de exaustão.

Após secagem, os ovos foram montados em *stubs* de carbono cobertos com fita carbono e recobertos com carbono (Denton High Vacuum Coater, EUA) e levados ao microscópio eletrônico de varredura (MEV).

Uma parte dos ovos de *S. mansoni* isolados dos fígados foram separados para análise em microscopia de varredura com transmissão (MEVT). Os ovos foram fixados em tampão salino fosfatado contendo glutaraldeído a 3% seguido por tetróxido de ósmio a 1% e embebidos em resina EPON, seccionados no ultramicrotomo Leica EM UC7 (Leica Microsystems, Alemanha) com lâminas de diamante, montados em *grids* de alumínio usados para microscopia eletrônica cobertos com Formvar e recobertos com carbono.

Espectroscopia por dispersão de energia

A análise qualitativa por espectroscopia por dispersão de energia (EDS) dos ovos, montados em *stubs* de carbono com fita de carbono dupla face, foram realizadas no microscópio eletrônico de varredura (MEV) JEOL 6610 (Tóquio, Japão) acoplado com o detector para microanálise por EDS Oxford Inca (High Wycombe, Inglaterra). O microscópio foi operado com a voltagem de aceleração a 15 KV e os ovos em imagens de elétrons retroespalhados (BSE), o EDS foi analisado por 60 segundos e a 10 mm de distância da amostra. Como controle negativo, realizou-se EDS no *stub* de carbono e na fita de carbono dupla face utilizada para fixar os ovos.

Os ovos de *S. mansoni* montados em *grids* foram analisados no MEVT JEOL JEM 2100 acoplado com EDS Oxford Inca, operado voltagem de aceleração a 200 KV com o sistema de imagens em campo escuro anular em alto ângulo (HAADF), com espectro de raios-X por no mínimo 60 segundos. A amostra foi posicionada a uma inclinação de 25° para o detector EDS. Como controle negativo, realizou-se EDS na resina EPON e no *grid* usado na análise.

RESULTADOS

A espectroscopia realizada no *stub*, como controle negativo, resultou na presença de carbono (C) e oxigênio (O). A presença de picos de enxofre (S) e sódio (Na) foi detectada na fita dupla face de carbono. O elemento silício encontrado em todos os ovos deve ser proveniente do composto HMDS que possui silício em sua fórmula ($C_8H_{19}NSi_2$) e no MEVT pode ser devido a contaminação ambiental dos

grids. A presença de cloro está relacionada com a resina EPON (Eneström & Kniola 1992).

A microanálise de raios-X na casca dos ovos dos nematódeos *A. lumbricoides* e *H. contortus* apresentou elementos químicos tais como carbono (C), oxigênio (O), potássio (K), sódio (Na) e fósforo (P), a presença de metais na casca, se presente, ficou abaixo do limite de detecção do equipamento. O EDS em ovos inférteis e decorticados de *A. lumbricoides* não evidenciou diferença composicional em relação ao ovo fértil (dados não mostrados). A figura 1 apresenta o resultado da análise de *A. lumbricoides*.

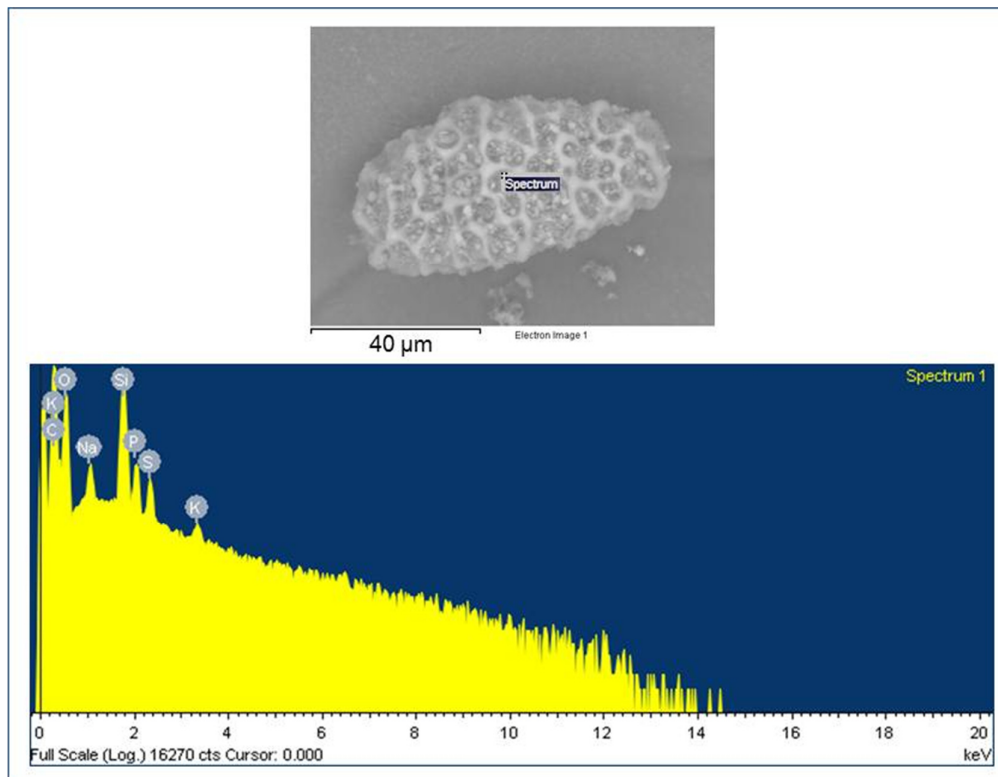


Figura 1: Microanálise por EDS em ovo fértil de *A. lumbricoides*.

A análise do ovo de *H. contortus* é visualizada na figura 2. Nota-se na foto, após a dessecação por HMDS, a formação de uma estrutura laminar da casca do ovo.

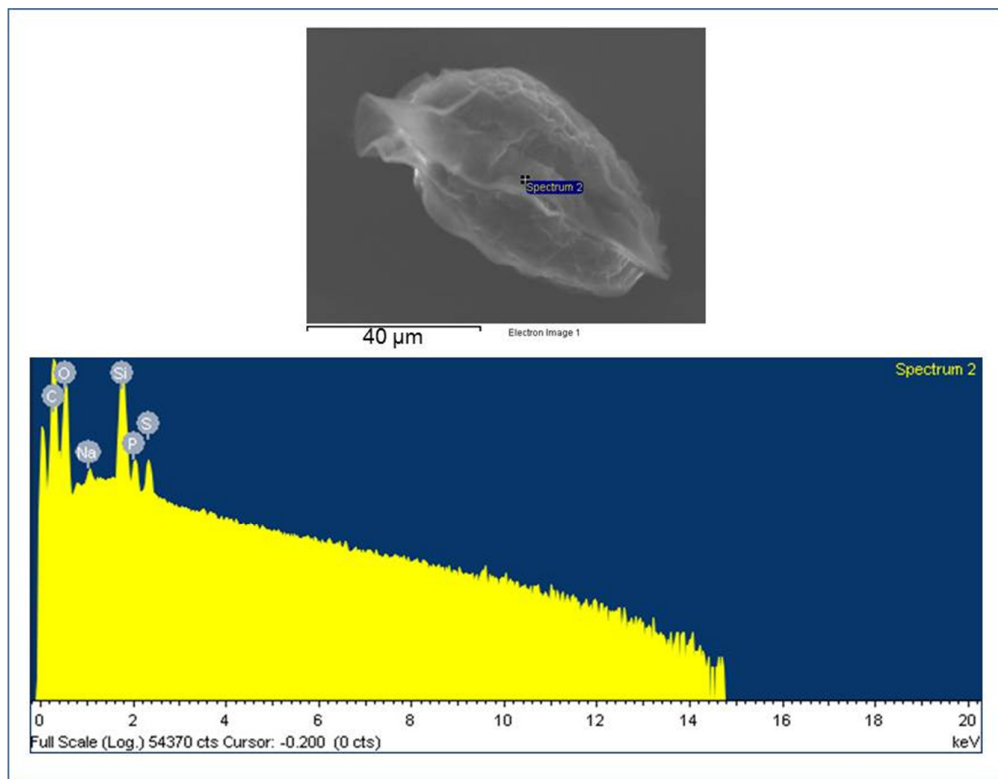


Fig. 2: Microanálise por EDS em ovo de *H. contortus*

O EDS realizada nos ovos dos trematódeos demonstrou a presença dos mesmos elementos químicos formadores da casca do ovo dos parasitos anteriores, adicionalmente com a presença de cobre (Cu) para ovos de *F. gigantica*, figura 3.

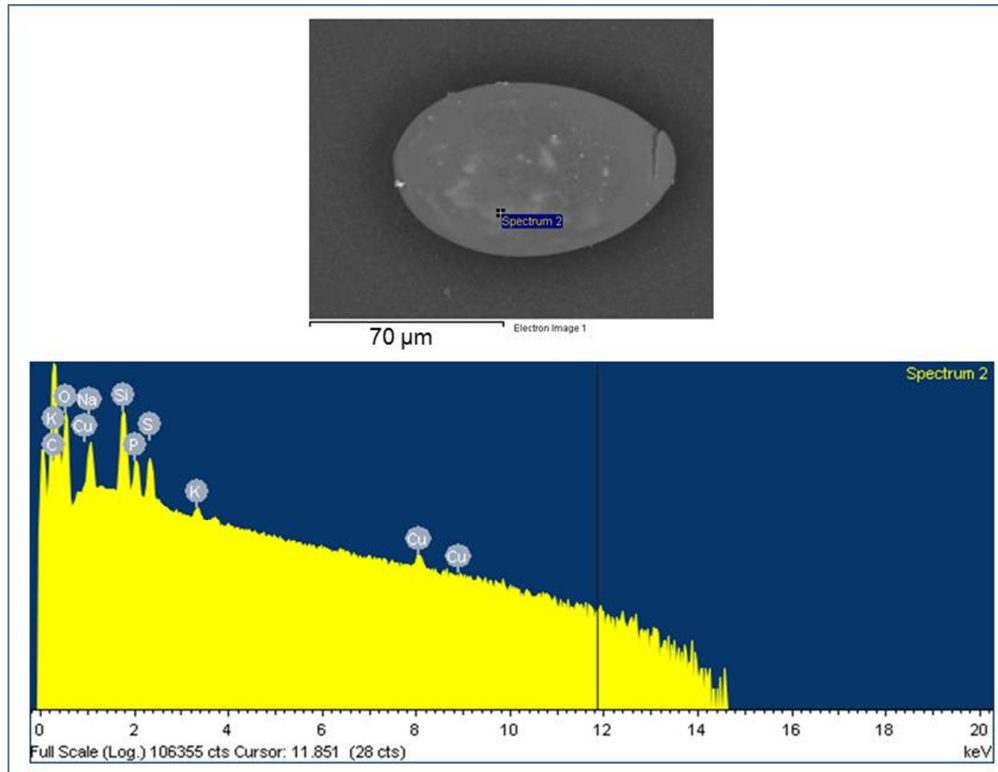


Fig. 3: Microanálise por EDS em ovo de *F. gigantica*.

No ovo de *F. magna*, figura 4, pode-se observar um alto pico de cálcio no espectro.

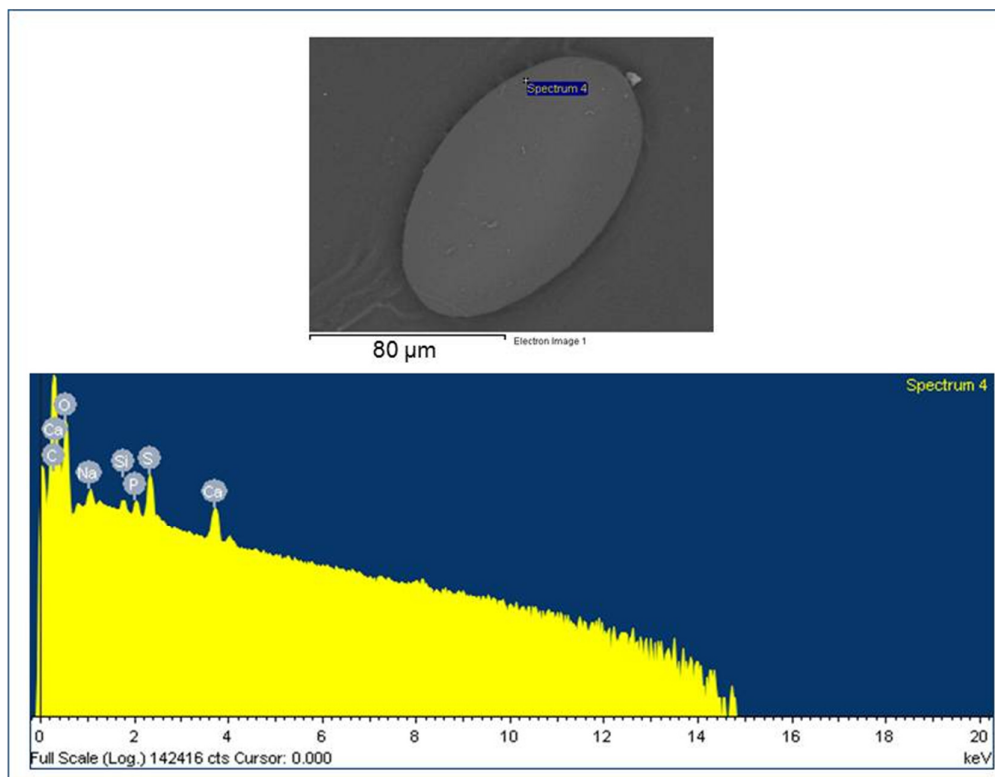


Fig. 4: Microanálise por EDS em ovo de *F. magna*.

Além da casca do ovo do *S. mansoni*, apresentado na figura 5, também foi examinado o espinho, figura 6. Detectou-se a presença de ferro (Fe) na casca e no espinho do ovo.

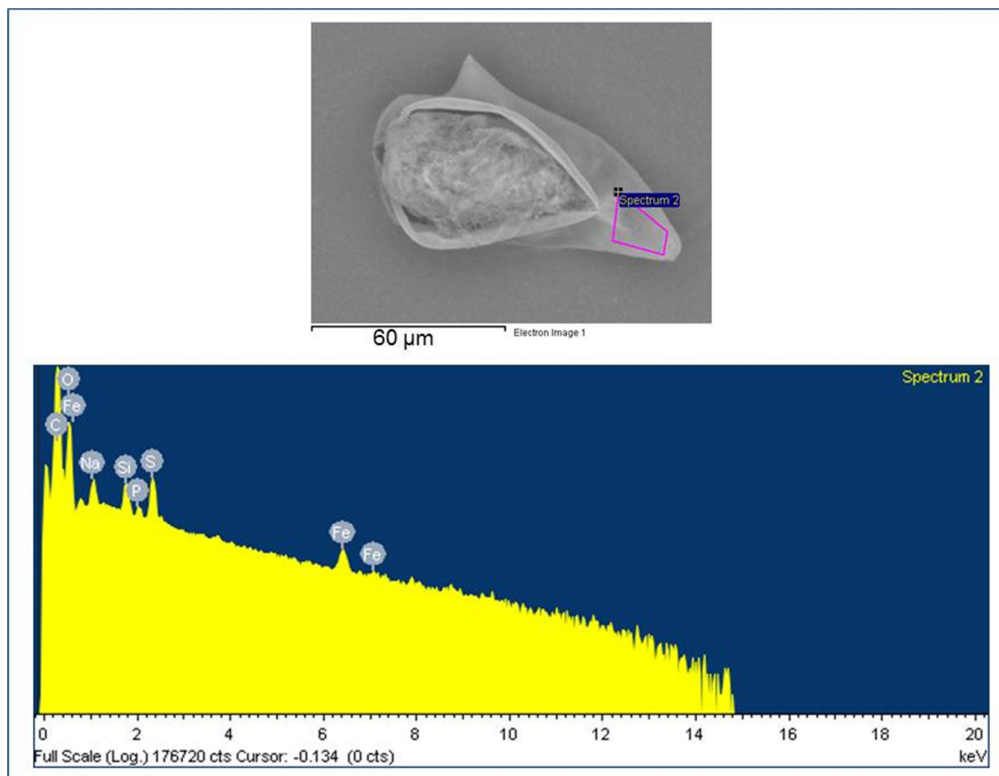


Fig. 5: Microanálise por EDS em ovo de *S. mansoni*.

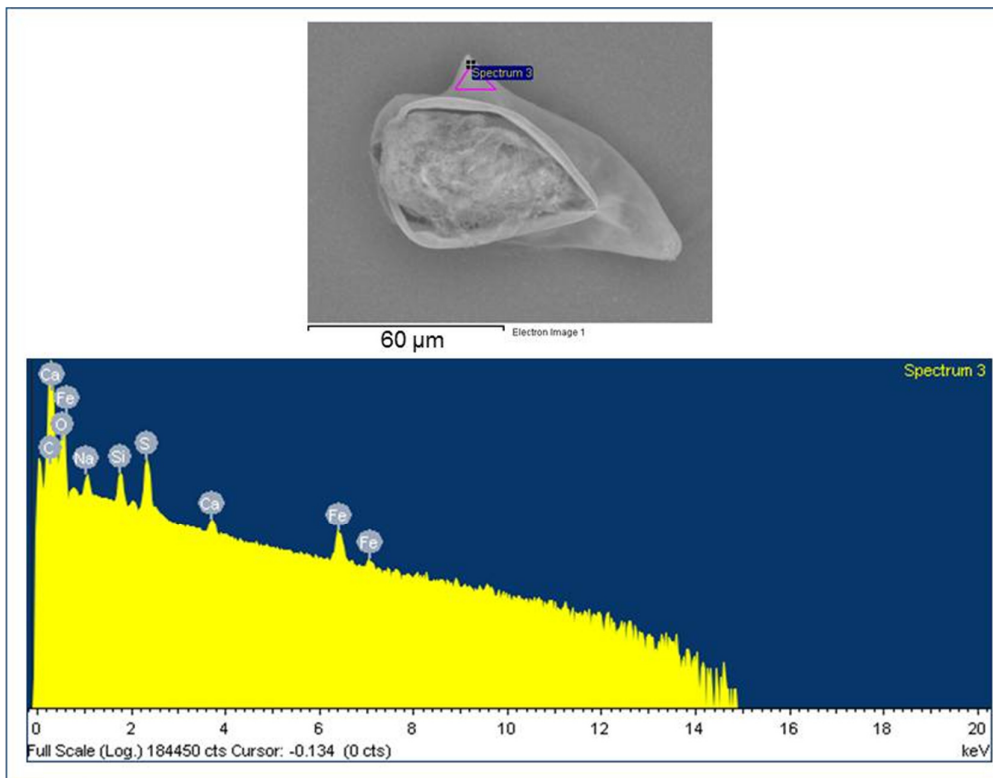


Fig. 6: Microanálise por EDS no espinho do ovo de *S. mansoni*.

A análise por área no miracídio não evidenciou a presença de ferro significativa para a detecção do equipamento.

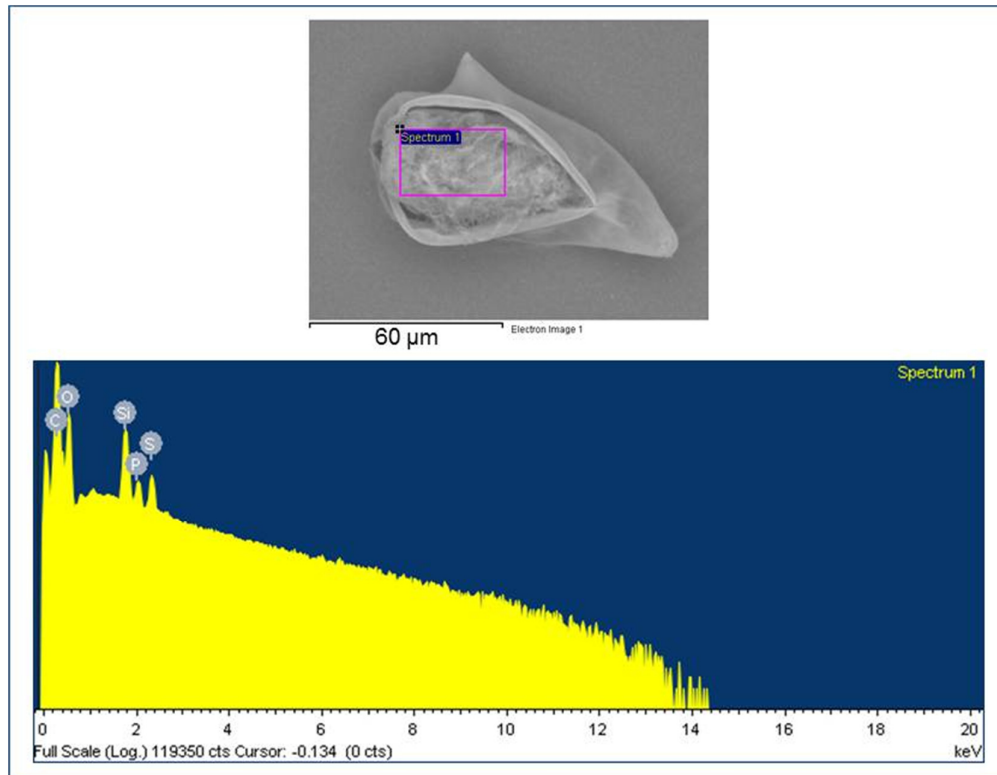


Fig. 7: Microanálise por EDS no miracídio de *S. mansoni*.

A análise dos ovos de *S. mansoni* por MEVT permitiu visualizar a porção interna da casca do ovo e seus constituintes. Pelo sistema de imagens HAADF foi possível visualizar pequenas estruturas com alto número atômico devido a sua coloração mais brilhante que as demais estruturas da casca. Também foi possível visualizar diversos poros constituintes da casca. A microanálise da casca do ovo em dois pontos distintos está ilustrada na figura 8.

Foram analisadas duas regiões distintas na casca do ovo (ponto 01 e 02). Como resultado observou-se uma grande diferença na contagem de raios-X emitidos entre o ponto 01 e 02. O ponto 02 apresentou picos mais elevados para ferro e oxigênio quando comparado com o ponto 01.

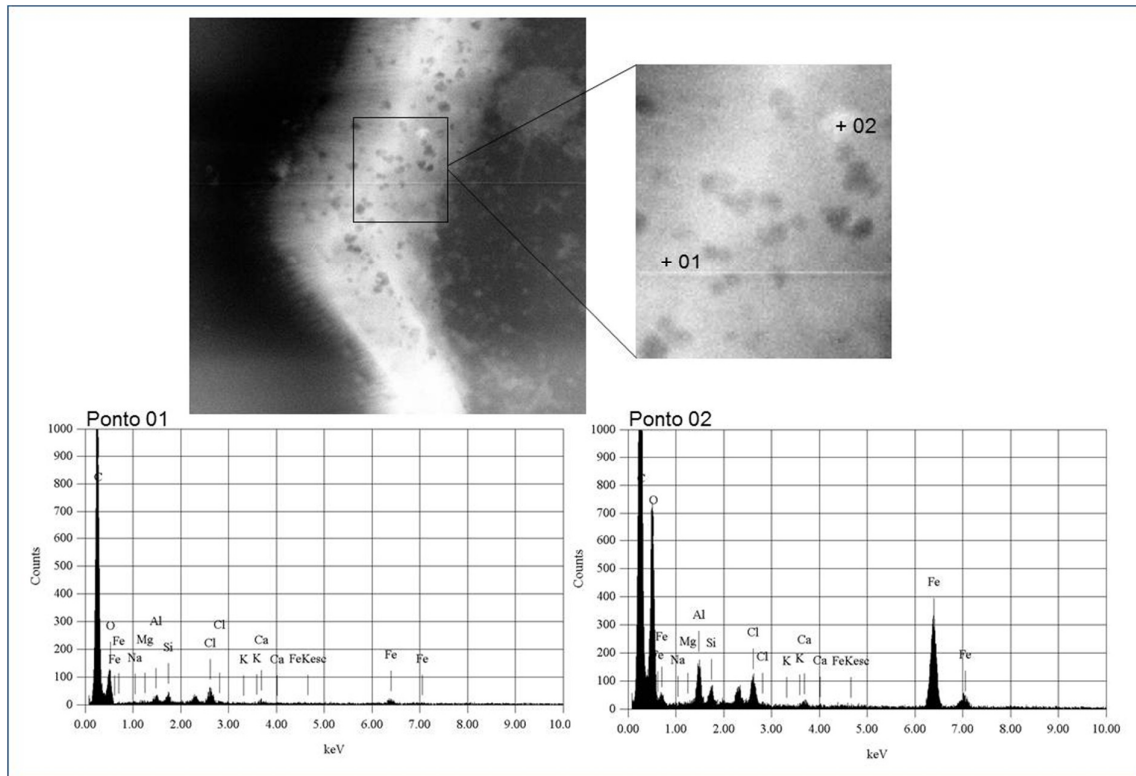


Fig. 8: Microanálise por EDS em dois pontos da casca do ovo de *S. mansoni* usando MEVT.

DISCUSSÃO

A nutrição dos helmintos é baseada nas substâncias encontradas no seu habitat e servem para suprir as necessidades vitais e a grande produção de ovos desses parasitos. Muito das substâncias ingeridas servirão para a produção e formação da casca dos ovos eliminados. A casca dos ovos dos helmintos

geralmente são multilaminadas e desenhadas para serem resistentes a mudanças ambientais (Ray Gamble et al. 1995).

O estudo de elementos químicos formadores dos ovos dos parasitos analisados por espectroscopia por dispersão de energia pode fornecer indícios de como o processo de formação da casca é realizado. A presença de determinados elementos, como o ferro, pode atuar como cofator nesse processo (Jones et al. 2007). Todavia, o excesso de ferro é tóxico (de Silva et al. 1996).

O nematódeo *A. lumbricoides* vive e alimenta-se no intestino, um ambiente rico em elementos orgânicos, inorgânicos e traços de metais, como o ferro (Anderson et al. 2009). Inclusive a presença de uma hemoglobina própria de ascarídeos foi encontrada no líquido extracelular de vermes adultos (Darawshe et al. 1987). Os elementos encontrados pelo EDS constituindo o ovo foram carbono, oxigênio, potássio, sódio e fósforo. Quilès et al. (2006) caracterizaram bioquimicamente a casca do ovo com a presença de mucopolissacarídeos, proteínas e quitina, o estudo não relata a presença de hemoglobina ou ferro na casca do ovo, corroborando com os dados encontrados no presente estudo. A presença de enxofre no espectro pode estar associada a mucopolissacarídeos presentes na membrana do ovo. Estes mucopolissacarídeos sulfatados poderiam contribuir para propriedades aderentes da superfície dos ovos.

O nematódeo *H. contortus* vive fixado na parede do abomaso de ruminantes e alimenta-se de sangue. Ingerindo uma grande quantidade de eritrócitos e, conseqüentemente ferro (Zajac 2006). O ovo apresenta uma fina casca maleável e de fácil ruptura para liberar a larva. A análise por EDS do ovo detectou os elementos constituintes da matéria orgânica, não apresentando ferro a despeito da alta ingestão de eritrócitos (Zajac 2006). Essa ausência pode ser atribuída ao processo

metabólico responsável pela degradação da hemoglobina em aminoácidos livres (Williamson et al. 2003)

O trematódeo *F. magna* vive dentro de uma cápsula fibrosa no parênquima hepático. A cápsula fibrótica é resultado do processo fibrogênico onde o colágeno, uma esclero-proteína com alto teor de cálcio tem papel importante na formação da fibrose (Du et al. 2000; Andrade 2005). A análise demonstra um alto pico de cálcio presente na casca do ovo.

O ducto biliar é uma rota de excreção de cobre pelo organismo (Cikrt 1972) e também o habitat do trematódeo *F. gigantica*. A presença de cobre na casca do ovo do parasito corrobora com os dados de Colhoun et al. (1998) onde a síntese da casca do ovo de *Fasciola hepatica* é mediada pela enzima fenol-oxidase dependente de cobre.

A presença de ferro nos ovos de *S. japonicum* e vermes de *S. mansoni* foi demonstrada por Jones et al. (2007) e WoldeMussie & Bennett (1982) Em ovos do *S. mansoni* foi detectado a presença de ferro na casca e no espinho do ovo regularmente distribuído. No processo de formação do ovo aproximadamente 40 células vitelínicas juntam-se ao embrião contendo precursores da formação da casca (Ebersberger et al. 2005). As células vitelínicas apresentam ferritina e podem estar envolvidas na proteção do miracídio contra bactérias ou na interação miracídio-caramujo (Jones et al. 2007). A análise do miracídio não demonstrou a presença de ferro sugerindo que a ferritina encontrada pode ter sido utilizada na continuação da formação da casca durante o curso do ovo até o ambiente, transformando a casca numa matriz rígida (Dewalick et al. 2011).

A microscopia de varredura com transmissão evidenciou uma estrutura cristalina com elementos de alto número atômico que quando analisado apresentou

elevada contagem de raios-X para ferro e oxigênio quando comparado com outro ponto da casca.

A presença dessa estrutura, possivelmente um óxido de ferro na casca do ovo do parasito sugere uma maneira de desintoxicação de ferro pelo parasito. A ingestão de uma grande quantidade de eritrócitos torna essencial a presença de um sistema de desintoxicação por parte do parasito (Toh et al. 2010). É possível que o ferro ingerido seja utilizado pelas células vitelínicas, na forma de ferritina ou na síntese tanante da quinona no processo de formação da casca. De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho, além do processo de desintoxicação por parte do parasito poderia haver outra forma de eliminação do ferro através da formação de óxidos de ferro sendo depositados na casca.

A formação de estruturas biológicas rígidas, por exemplo, ossos e ovos são dependentes da deposição de minerais inorgânicos específicos de uma maneira controlada (Lowenstam 1981). O processo de biomineralização controlada é responsável pela formação de nano cristais magnéticos dentro de bactérias magnetotáticas, principalmente magnetita (Fe_3O_4), além de estar presente em algas, insetos, moluscos, peixes, pássaros e até mesmo em humanos (Schüler & Frankel 1999). A magnetita é o principal componente dos magnetossomos das bactérias magnetotáticas e servem para orientação geomagnética (Blakemore 1982).

O processo de biomineralização induzida encontrado em bactérias de ambientes anaeróbicos forma partículas minerais, inclusive magnetita, mas sem uma forma definida, com tamanhos irregulares e inclusão de outras impurezas (Frankel & Bazylinski 2003).

A presença de cristais com alto teor de ferro e oxigênio na casca do ovo de *S. mansoni* pode ser o resultado de um processo de biomineralização induzida com intuito de eliminar o excesso de ferro absorvido durante a hematofagia.

Já foi descrito a presença de cristais contendo ferro no lúmen intestinal dos esquistossomos. A hemozoína é o resultado do processo da cristalização do heme e possui nitrogênio em sua composição química (Oliveira et al. 2005; Toh et al. 2010).

Os cristais encontrados na casca do ovo não demonstraram a presença de nitrogênio nas análises realizadas no MEV e MEVT reforçam a ideia da presença de um óxido de ferro, provavelmente magnetita na casca. A presença desses pequenos cristais poderia estar associada ao comportamento magnético dos ovos (Teixeira et al. 2007).

Em conclusão foram identificados elementos químicos suscetíveis de magnetização na casca do ovo de *S. mansoni* o que consolida a ideia de aprimorar o diagnóstico parasitológico da esquistossomose empregando o princípio inovador do biomagnetismo. A partir do interesse em desvendar o mecanismo de interação magnética utilizada para o isolamento dos ovos pelo método Helmintex, foram obtidos resultados que contribuem para uma melhor compreensão da biologia do parasito e da relação parasito-hospedeiro-habitat.

AGRADECIMENTOS

Ao pesquisador Graeme Auchterlonie pelo auxílio no MEVT e as técnicas Erica Lovas e Eunice Grinan pelo processamento das amostras e operação do MEV-EDS. A CAPES/PDEE pela bolsa concedida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anderson GJ, Frazer DM, McLaren GD 2009. Iron absorption and metabolism. *Current Opinion in Gastroenterology*, 25, 129-135.

Andrade ZA 2005. Regression of hepatic fibrosis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 38, 514-520.

Barreto ML, Smith DH, Sleight AC 1990. Implications of faecal egg count variation when using the Kato-Katz method to assess *Schistosoma mansoni* infections. *Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 84, 554-555.

Blakemore RP 1982. Magnetotactic Bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 36, 217-238.

Chitsulo L, Engels D, Montresor A, Savioli L 2000. The global status of schistosomiasis and its control. *Acta Tropica*, 77, 41-51.

Chitsulo L, Loverde P, Engels D 2004. Focus: Schistosomiasis. *Nature Reviews Microbiology*, 2, 12-13.

Cikrt M 1972. Biliary excretion of ²⁰³Hg, ⁶⁴Cu, ⁵²Mn, and ²¹⁰Pb in the rat. *British Journal of Industrial Medicine*, 29, 74-80.

Colhoun LM, Fairweather I, Brennan GP 1998. Observations on the mechanism of eggshell formation in the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Parasitology*, 116 (Pt 6, 555-567.

Coura JR, Amaral RS 2004. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic areas. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99, 13-19.

Cringoli G, Rinaldi L, Maurelli MP, Utzinger J 2010. FLOTAC: new multivalent techniques for qualitative and quantitative copromicroscopic diagnosis of parasites in animals and humans. *Nature Protocols*, 5, 503-515.

Dalton JP, Day SR, Drew AC, Brindley PJ 1997. A method for the isolation of schistosome eggs and miracidia free of contaminating host tissues. *Parasitology*, 115 29-32.

Darawshe S, Tsafadyah Y, Daniel E 1987. Quaternary structure of erythrocrucorin from the nematode *Ascaris suum*. Evidence for unsaturated haem-binding sites. *Biochemical Journal*, 689-694.

Silva DM, Askwith CC, Kaplan J 1996. Molecular mechanisms of iron uptake in eukaryotes. *Physiological Reviews*, 76, 31-47.

Dewalick S, Tielens AG, van Hellemond JJ 2011. *Schistosoma mansoni*: The egg, biosynthesis of the shell and interaction with the host. *Experimental Parasitology*, in press.

Du C, Cui FZ, Zhang W, Feng QL, Zhu XD, de Groot K 2000. Formation of calcium phosphate/collagen composites through mineralization of collagen matrix. *Journal of Biomedical Materials Research*, 50, 518-527.

Ebersberger I, Knobloch J, Kunz W 2005. Cracks in the shell--zooming in on eggshell formation in the human parasite *Schistosoma mansoni*. *Development Genes and Evolution*, 215, 261-267.

Eneström S, Kniola B 1992. Epon resin infiltration and immunogold labelling of pituitary secretory granules after cryofixation versus chemical fixation. *Biotechnic & Histochemistry*, 67, 100-105.

Engels D, Sinzinkayo E, Gryseels B 1996. Day-to-day egg count fluctuation in *Schistosoma mansoni* infection and its operational implications. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 54, 319-324.

Frankel RB, Bazylnski DA 2003. Biologically Induced Mineralization by Bacteria. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 54, 95-114.

Gryseels B, Polman K, Clerinx J, Kestens L 2006. Human schistosomiasis. *The Lancet*, 368, 1106-1118.

Jones MK, McManus DP, Sivadorai P, Glanfield A, Moertel L, Belli SI, Gobert GN 2007. Tracking the fate of iron in early development of human blood flukes. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39, 1646-1658.

Kongs A, Marks G, Verle P, Van der Stuyft P 2001. The unreliability of the Kato-Katz technique limits its usefulness for evaluating *S. mansoni* infections. *Tropical Medicine & International Health*, 6, 163-169.

Lowenstam H 1981. Minerals formed by organisms. *Science*, 211, 1126-1131.

Oliveira MF, Kycia SW, Gomez A, Kosar AJ, Bohle DS, Hempelmann E, Menezes D, Vannier-Santos MA, Oliveira PL, Ferreira ST 2005. Structural and morphological characterization of hemozoin produced by *Schistosoma mansoni* and *Rhodnius prolixus*. *FEBS letters*, 579, 6010-6016.

Quilès F, Balandier JY, Capizzi-Banas S 2006. In situ characterisation of a microorganism surface by Raman microspectroscopy: the shell of *Ascaris* eggs. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 386, 249-255.

Ray Gamble H, Fetterer RH, Urban Jr JF 1995. 15 - Reproduction and Development in Helminths. In: JJ Marr, M Miklós, *Biochemistry and Molecular Biology of Parasites*, Academic Press, San Diego, p. 289-305.

Schüler D, Frankel RB 1999. Bacterial magnetosomes: microbiology, biomineralization and biotechnological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52, 464-473.

Teixeira CF, Neuhaus E, Ben R, Romanzini J, Graeff-Teixeira C 2007. Detection of *Schistosoma mansoni* eggs in feces through their interaction with paramagnetic beads in a magnetic field. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 1, e73.

Toh SQ, Glanfield A, Gobert GN, Jones MK 2010. Heme and blood-feeding parasites: friends or foes? *Parasites & Vectors*, 3, 108.

Williamson AL, Brindley PJ, Knox DP, Hotez PJ, Loukas A 2003. Digestive proteases of blood-feeding nematodes. *Trends in Parasitology*, 19, 417-423.

WoldeMussie E, Bennett JL 1982. Plasma spectrometric analysis for Na, K, Ca, Mg, Fe, and Cu in *Schistosoma mansoni* and *S. japonicum*. *Journal of Parasitology*, 68, 48-52.

Zajac AM 2006. Gastrointestinal nematodes of small ruminants: life cycle, anthelmintics, and diagnosis. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 22, 529-541.

CAPÍTULO 3

Caracterização magnética dos ovos de *Schistosoma* spp.

Rafael L. Maurer¹, Malcolm Jones, Robert C. Woodward, Tim G. St. Pierre, Carlos Graeff Teixeira

¹ Laboratório de Biologia Parasitária, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Avenida Ipiranga 6681, Prédio 12, Bloco C, Sala 239. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil, CEP 90619-900.

Correio eletrônico: maurer.rafael@gmail.com

RESUMO

Os vermes hematófagos do gênero *Schistosoma* ingerem grande quantidade de eritrócitos de seus hospedeiros. A digestão da hemoglobina libera heme que contém ferro. O ferro é sequestrado e utilizado pelos parasitos para o desenvolvimento do verme e formação do ovo. O objetivo do presente estudo é caracterizar as propriedades magnéticas dos ovos de *Schistosoma*. As medidas de amostra resfriada a campo zero (ZFC) e amostra resfriada com campo aplicado (FC) foram feitas utilizando o susceptômetro *Superconducting Quantum Interference Device* (SQUID) revelando a presença de compostos ferromagnéticos, possivelmente magnetita. Além de compostos paramagnéticos. O processo de biomineralização induzida pode ser o responsável pela formação da magnetita. A mensuração magnética feita neste estudo é um primeiro passo na identificação das partículas biomagnéticas e na descrição dos mecanismos envolvidos na mobilidade de ovos de *Schistosoma* quando submetidos a campo magnético.

Palavras-chave: SQUID, *Schistosoma*, magnetismo, ferromagnético, paramagnético, parasitos

INTRODUÇÃO

A esquistossomose é uma infecção parasitária causada pelo trematódeo do gênero *Schistosoma* e responsável por uma doença com significativa morbidade e mortalidade humana em países tropicais e em desenvolvimento. O *S. mansoni* e *S. japonicum* são os responsáveis pela esquistossomose intestinal e hepática, com hábitat nos vasos mesentéricos onde se alimentam de sangue e realizam a postura dos ovos que serão eliminados juntamente com as fezes (Gryseels et al. 2006).

A nutrição desses parasitos se dá basicamente pela ingestão de células vermelhas do sangue. E o ferro presente na hemoglobina do hospedeiro tem papel importante no desenvolvimento inicial e na fase adulta do parasito (WoldeMussie & Bennett 1982; Clemens & Basch 1989). O ferro é metabolizado e armazenado intracelularmente na forma de ferritina. Duas isoformas são encontradas, a primeira é chamada de ferritina do óvulo do esquistossomo (Fer1) e a segunda é a ferritina somática (Fer2) expressa preferencialmente em machos e também encontrada em fêmeas. A Fer1 encontra-se dentro das células vitelínicas e teria como função auxiliar o desenvolvimento do embrião no processo de formação da casca do ovo (Jones et al. 2007).

A casca do ovo é uma estrutura rígida, escurecida formada pela ligação cruzada de proteínas conhecida como síntese tanante da quinona, onde ocorre a formação de ligações de quinona (Dewalick et al. 2011) e onde o ferro presente nesse processo pode aumentar a eficiência da polimerização protéica da casca (Jones et al. 2007).

A presença de ferro na casca do ovo do *S. japonicum* foi bem documentada por Jones et al., 2007 utilizando espectroscopia por dispersão de dispersiva (EDS) e

espectrometria de massa acoplado a plasma indutivo (ICP-MS). O *S. mansoni* também apresentou ferro na casca em análise por EDS. Em análise por microscopia eletrônica de transmissão com varredura (MEVT) utilizando o sistema de imagens por campo escuro anular em alto ângulo (HAADF) foram observados pequenas estruturas cristalinas com alto número atômico. À análise por EDS nessas estruturas verificou-se a presença de uma grande contagem de raios-X para o elemento ferro e oxigênio quando comparado com a análise realizada em outro ponto da casca do ovo que não apresentava essa estrutura (dados não mostrados), sugerindo a presença de um óxido de ferro.

Tecidos biológicos normalmente exibem um comportamento diamagnético e apresentam uma baixa suscetibilidade magnética, da mesma ordem da suscetibilidade magnética da água pura. A análise das propriedades magnéticas utilizando um susceptômetro SQUID (*Superconducting Quantum Interference Device*) é muito útil por se tratar de uma metodologia não destrutiva e de alta sensibilidade que permite a detecção de pequenos desvios do valor normal devido à presença de substâncias específicas nos tecidos (Pizzella et al. 2001).

O presente estudo tem como objetivo avaliar diretamente e não destrutivamente a presença de material magnético dentro dos ovos de *S. japonicum* e *S. mansoni* mensurando a magnetização estática.

MATERIAL E MÉTODOS

Preparação da amostra

A cepa Porto Rico de *Schistosoma mansoni* é mantida em camundongos Swiss e moluscos *Biomphalaria glabrata* e o *Schistosoma japonicum* oriundo da China (Província de Anhui) fornecido pelo Instituto de Doenças Parasitárias, Shanghai, China, é mantido em camundongos Swiss e moluscos *Oncomelania hupensis hupensis*. O ciclo vital de ambos parasitos é mantido no *Queensland Institute of Medical Research – QIMR*.

Os ovos foram isolados de fígado de camundongos infectados pelo método descrito por Dalton et. al, 1997. Em todo o procedimento de isolamento e coleta dos ovos utilizou-se materiais não magnéticos.

Os ovos foram liofilizados (Dynavac, VIC, Austrália) e pesados para se determinar a massa seca.

Magnetização

O susceptômetro SQUID (MPMS-7, Quantum Design, CA) foi usado para mensurar o campo magnético. Os ovos liofilizados foram colocados em uma cápsula de gelatina e introduzidos dentro de um tubo de polipropileno. A suscetibilidade dependente de temperatura foi investigada após o teste de amostra resfriada a campo zero (ZFC) e amostra resfriada com campo aplicado (FC). Nas medidas ZFC, as amostras na temperatura ambiente são resfriadas a baixas temperaturas em campo magnético nulo. Em seguida um campo magnético constante é aplicado, e as

medidas são feitas durante o aquecimento da amostra. Nas medidas FC o resfriamento a partir da temperatura ambiente é feito sob ação de campo magnético constante até baixas temperaturas.

A amostra foi resfriada de 300 K (26 °C) a 5 K (-268 °C) em campo magnético variando de 0 (ZFC) a 100 Oe (FC), dessa forma a suscetibilidade magnética foi medida no campo de 100 Oe em função da temperatura.

Para a análise no magnetômetro utilizou-se 82 mg de ovos liofilizados do *S. mansoni* e 61 mg de ovos liofilizados do *S. japonicum*.

RESULTADOS

Após a subtração do campo diamagnético da curva de histerese nas duas análises, figuras 1 e 2 para *S. mansoni* e *S. japonicum*, respectivamente, nota-se a presença de material ferromagnético a temperatura ambiente, mostrado no ponto localizado fora das curvas ZFC-FC.

A separação das curvas FC-ZFC não é temperatura dependente e é, provavelmente, devida a presença de componentes ferromagnéticos da amostra. Quando ovos dos dois parasitos são comparados observa-se uma separação maior das curvas no *S. japonicum* do que no *S. mansoni*, além de permanecer no campo de momento magnético positivo indicando a presença de uma quantidade maior de material ferromagnético.

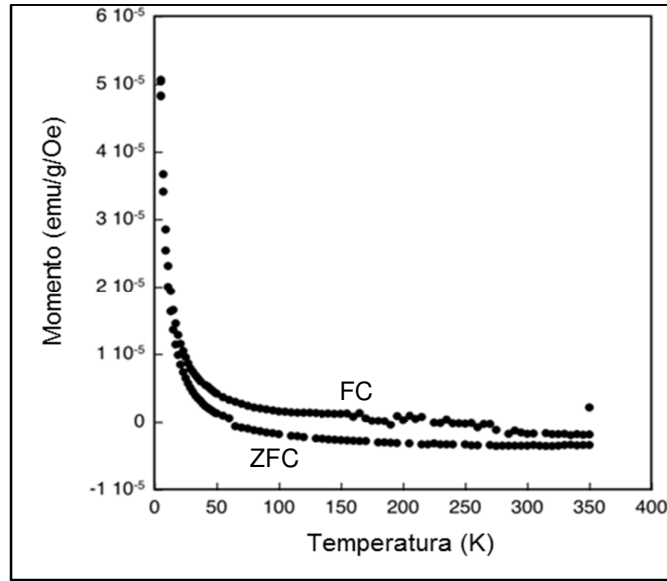


Fig. 1: Momento magnético dependente de temperatura após o ZFC e FC para ovos de *S. mansoni*.

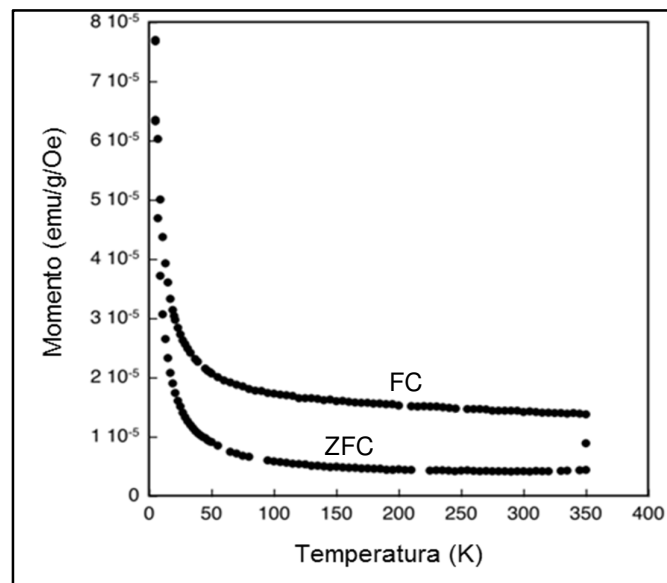


Fig. 2: Momento magnético dependente de temperatura após ZFC e FC para ovos de *S. japonicum*.

Quando plotadas em função do inverso da temperatura ($1/T$) as medidas ZFC-FC apresentam duas linhas razoavelmente retas indicando a presença de componentes paramagnéticos para as duas amostras. Novamente o *S. japonicum* apresenta uma quantidade maior de componente paramagnético que o *S. mansoni*, figuras 3 e 4 para *S. mansoni* e *S. japonicum*, respectivamente.

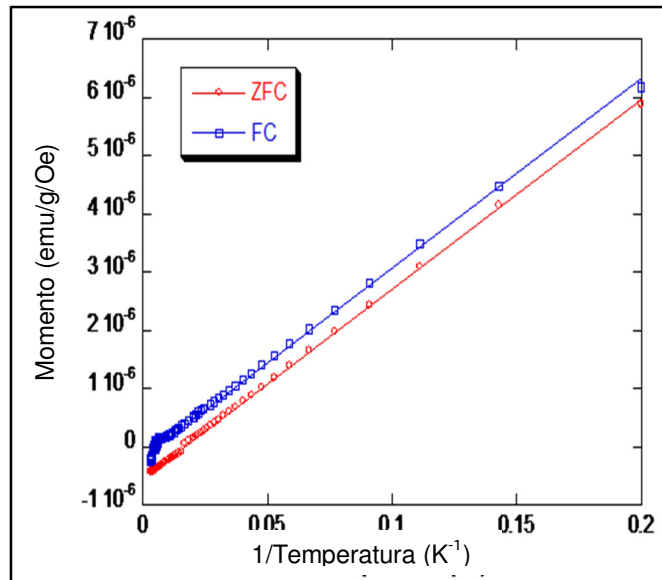


Fig 3: Curva ZFC-FC de *S. mansoni* em função do inverso da temperatura.

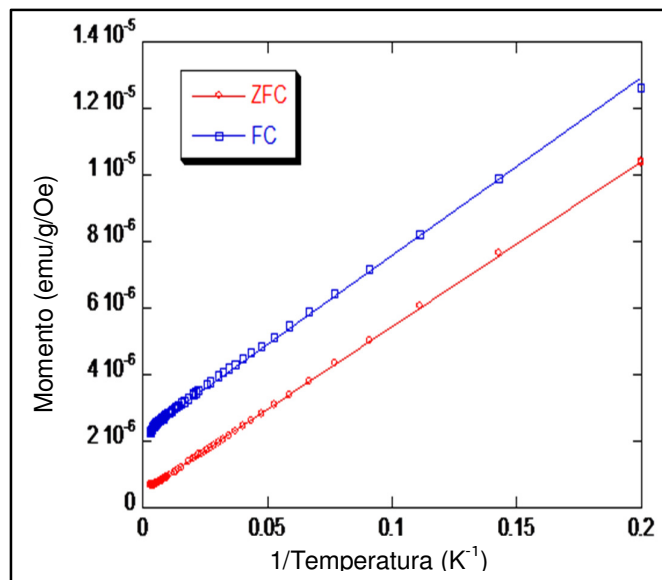


Fig. 4: Curva ZFC-FC de *S. japonicum* em função do inverso da temperatura.

DISCUSSÃO

Este artigo relata a primeira caracterização magnética de ovos do parasito hematófago *Schistosoma* spp.. Nossos achados demonstram a presença de material com momento magnético remanescente em temperatura ambiente na casca do ovo das duas espécies analisadas. Acredita-se que esse material ferromagnético seja magnetita (Fe_3O_4), pois sua presença é descrita em diversos seres vivos e apresenta propriedades magnéticas do tipo ferromagnético (Noguchi et al. 1999; Schüller & Frankel 1999). Os esquistossomos nutrem-se de sangue e por hemoglobínólise liberam o grupo heme da hemoglobina. Heme é indicada como a possível fonte de ferro na dieta desses parasitos (Toh et al. 2010).

A eliminação do excesso de ferro liberado durante a biossíntese na forma de magnetita poderia ser mediada via biomineralização induzida (Schüller & Frankel 1999).

A presença de diversos poros na casca do ovo de *S. mansoni* poderia explicar a menor quantidade de material ferromagnético quando comparado com os ovos de *S. japonicum* que apresentam uma estrutura uniforme sem a presença de poros (Neill et al. 1988; Jones et al. 2008).

Além da presença de material ferromagnético, também há material paramagnético, de acordo com os gráficos das figuras 3 e 4. Novamente ocorre a maior presença de material paramagnético no *S. japonicum* devido a uma maior diferença nas curvas ZFC-FC.

A ferritina é a principal proteína de armazenamento de ferro do fígado e apresenta um comportamento antiferromagnético quando analisada pelo SQUID. De acordo com o resultado das análises é possível afirmar que as amostras utilizadas

no experimento estão livres da contaminação de tecido hepático, pois seu comportamento apresenta uma anomalia a baixas temperaturas (Friedman et al. 1997; Makhlouf et al. 1997).

A origem do material paramagnético é desconhecida, podendo ser um indicativo da presença de hemozoína. A hemozoína é o produto da cristalização da heme livre em pigmentos escuros como forma de digestão do sangue e encontra-se presente em grande quantidade no lúmen intestinal do *S. mansoni*, podendo ser resultado do processo de biomineralização induzida como forma de desintoxicação do parasito (Oliveira et al. 2005). A composição química da heme é baseada na ligação de um átomo de ferro a 4 átomos de nitrogênio do anel pirólico da protoporfirina IX (Toh et al. 2010).

As microanálises por EDS em experimentos prévios não demonstraram a presença de nitrogênio no espectro sendo improvável a presença de hemozoína nos ovos de *Schistosoma* (dados não mostrados).

Imagens subsequentes geradas a partir da análise elementar de ovos no microscópio eletrônico de transmissão indicam a presença de partículas contendo alto teor de fósforo, oxigênio e ferro e podem ser responsáveis pelo comportamento paramagnético do ovo.

A possível presença de magnetita e de outro composto desconhecido com propriedades paramagnéticas possibilita o uso de técnicas de separação magnética, como descrito por Teixeira et al. (2007), para melhorar o diagnóstico da esquistossomose. Estes achados estimulam novas investigações sobre as rotas metabólicas envolvendo o metabolismo do ferro em helmintos, o que poderá resultar em novas modalidades de tratamento e melhor entendimento da fisiologia dos esquistossomos.

AGRADECIMENTOS

A *University of Western Australia* por permitir a realização das análises magnética. A CAPES/PDEE pela bolsa concedida

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Clemens LE, Basch PF 1989. *Schistosoma mansoni*: effect of transferrin and growth factors on development of schistosomula in vitro. *Journal of Parasitology*, 75, 417-421.

Dalton JP, Day SR, Drew AC, Brindley PJ 1997. A method for the isolation of schistosome eggs and miracidia free of contaminating host tissues. *Parasitology*, 115 29-32.

Dewalick S, Tielens AG, van Hellemond JJ 2011. *Schistosoma mansoni*: The egg, biosynthesis of the shell and interaction with the host. *Experimental Parasitology*, in press.

Friedman JR, Voskoboynik U, Sarachik MP 1997. Anomalous magnetic relaxation in ferritin. *Physical Review B*, 56, 10793-10796.

Gryseels B, Polman K, Clerinx J, Kestens L 2006. Human schistosomiasis. *The Lancet*, 368, 1106-1118.

Jones MK, Bong SH, Green KM, Holmes P, Duke M, Loukas A, McManus DP 2008. Correlative and dynamic imaging of the hatching biology of *Schistosoma japonicum* from eggs prepared by High Pressure Freezing. *PLoS Neglected Tropical Disease*, 2, e334.

Jones MK, McManus DP, Sivadorai P, Glanfield A, Moertel L, Belli SI, Gobert GN 2007. Tracking the fate of iron in early development of human blood flukes. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39, 1646-1658.

Makhlouf SA, Parker FT, Berkowitz AE 1997. Magnetic hysteresis anomalies in ferritin. *Physical Review B*, 55, R14717-R14720.

Neill PJ, Smith JH, Doughty BL, Kemp M 1988. The ultrastructure of the *Schistosoma mansoni* egg. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 39, 52-65.

Noguchi Y, Fujiwara T, Yoshimatsu K, Fukumori Y 1999. Iron reductase for magnetite synthesis in the magnetotactic bacterium *Magnetospirillum magnetotacticum*. *Journal of Bacteriology*, 181, 2142-2147.

Oliveira MF, Kycia SW, Gomez A, Kosar AJ, Bohle DS, Hempelmann E, Menezes D, Vannier-Santos MA, Oliveira PL, Ferreira ST 2005. Structural and morphological characterization of hemozoin produced by *Schistosoma mansoni* and *Rhodnius prolixus*. *FEBS Letters*, 579, 6010-6016.

Pizzella V, Penna SD, Gratta CD, Romani GL 2001. SQUID systems for biomagnetic imaging. *Superconductor Science and Technology*, 14, R79-R114.

Schüler D, Frankel RB 1999. Bacterial magnetosomes: microbiology, biomineralization and biotechnological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52, 464-473.

Teixeira CF, Neuhauss E, Ben R, Romanzini J, Graeff-Teixeira C 2007. Detection of *Schistosoma mansoni* eggs in feces through their interaction with paramagnetic beads in a magnetic field. *PLoS Neglected Tropical Disease*, 1, e73.

Toh SQ, Glanfield A, Gobert GN, Jones MK 2010. Heme and blood-feeding parasites: friends or foes? *Parasites & Vectors*, 3, 108.

WoldeMussie E, Bennett JL 1982. Plasma spectrometric analysis for Na, K, Ca, Mg, Fe, and Cu in *Schistosoma mansoni* and *S. japonicum*. *Journal of Parasitology*, 68, 48-52.

CONCLUSÕES GERAIS

- Há diferença entre características biológicas do cepa Esteio do *S.mansoni* e dados da literatura sobre isolados de outras áreas geográficas no que se refere a relação macho:fêmea e o número de vermes machos encontrados.
- A baixa taxa de infecção das cercárias associada com a presença da alta taxa de infecção unissexual de machos possibilita inferir que o foco de transmissão de Esteio mantém-se próximo a um limiar, abaixo do qual a erradicação via ação antrópica ou a extinção possa ocorrer por causas naturais.
- Existe ferro na casca do ovo do *S. mansoni*, de forma dispersa de elementos químicos e compostos químicos.
- A presença de duas formas (elemento químico e composto químico) sugere que os átomos de ferro atuam no processo de biossíntese do ovo e os cristais como forma de desintoxicação, sendo eliminados na forma de pequenos cristais, possivelmente magnetita.
- O elemento ferro não foi encontrado nos ovos dos parasitos das espécies *Ascaris lumbricoides*, *Haemonchus contortus*, *Fasciola gigantica* e *Fascioloides magna*. Com os dados desse trabalho não é possível confirmar a hipótese da presença de ferro na casca dos ovos com as categorias taxonômicas ou hábitos alimentares dos parasitos analisados.
- A descoberta de propriedades magnéticas do tipo paramagnético e ferromagnético na casca do ovo do *Schistosoma* contribui para a explicação do mecanismo do método Helmintex e abre possibilidade para o desenvolvimento de novos diagnósticos e formas de tratamento.

ANEXO

Tabela evidenciando os elementos químicos encontrados em comum e característico de cada ovo examinado pela microanálise por raios -X (EDS).

Helminto	Elementos em comum	Elementos característicos
<i>Ascaris lumbricoides</i>	C, O, Na, Si, P, S	Cl, K
<i>Haemonchus contortus</i>	C, O, Na, Si, P, S	
<i>Fascioloides magna</i>	C, O, Si, P, S	Ca
<i>Fasciola gigantica</i>	C, O, Na, Si, P, S	Ca, Cu
<i>Schistosoma mansoni</i>	C, O, Na, Si, P, S	Ca, Fe

Legenda: C: carbono; O: oxigênio; Na: sódio; Si: silício; P: fósforo; S: enxofre; Ca: cálcio; Cu: cobre; Fe: ferro; Cl: cloro; K: potássio