

MELISSA QUERIDO CÁRDENAS ROSSAS

“ASPECTOS ULTRAESTRUTURAIS
COMPARATIVOS DE *Litomosoides chagasfilhoi*
MORAES-NETO, LANFREDI & DE SOUZA, 1997
(NEMATODA: ONCHOCERCIDAE) SUBMETIDOS
IN VIVO À DIETILCARBAMAZINA, ALBENDAZOL
E À CO-ADMINISTRAÇÃO DESTES DOIS
FÁRMACOS”

TESE SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU
DE DOUTOR EM CIÊNCIAS



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

FICHA CATALOGRÁFICA

CÁRDENAS, Melissa Querido

“Aspectos ultraestruturais comparativos de *Litomosoides chagasfilhoi* (Nematoda: Onchocercidae) submetidos *in vivo* à dietilcarbamazina, albendazol e à co-administração destas duas drogas”.

Rio de Janeiro.

xi, 120 p.

Orientador: Reinalda Marisa Lanfredi

Tese: Doutor em Ciências Biológicas (Biofísica) – UFRJ/ IBCCF

1. Nematoda 2. Filária 3. *Litomosoides chagasfilhoi* 4. Quimioterapia 5. *Wolbachia* 6. Ultraestrutura 9. Onchocercidae

I. Lanfredi, RM II. Universidade Federal do Rio de Janeiro – Centro de Ciências da Saúde – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – Programa de Biologia Celular e Parasitologia.

III. Título

O presente trabalho foi realizado nos Laboratórios de Biologia de Helminhos Otto Wucherer e de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer do Programa de Biologia Celular e Parasitologia, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob orientação da Dra. Reinalda Marisa Lanfredi e com auxílio financeiro das seguintes instituições:

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e tecnológico (CNPq)
- Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Ensino superior (CAPES)
- Fundação Universitária José Bonifácio (FUJB)
- Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ)

Ao meu amado Jesus, por sua eterna fidelidade e amor, e por renovar as minhas forças nos momentos mais difíceis.

Ao Marcus, meu amado marido, pelo apoio, cumplicidade, carinho e amor prestados ao longo destes anos. Obrigada por estar ao meu lado a cada instante, e por acreditar tanto em mim.

À minha mãe, Elaine, uma vencedora, sem a qual eu jamais teria chegado aqui. Obrigada por todo amor e amizade.

*“Todas as coisas foram feitas por intermédio Dele,
e sem Ele nada do que foi feito se fez.”*

(Jo 1: 3)

AGRADECIMENTOS

À Dra. Reinalda Marisa Lanfredi pela orientação, carinho, paciência e amizade, e principalmente pelos preciosos ensinamentos ao longo destes anos, que certamente levarei comigo ao longo da vida. Obrigada por vir comigo até aqui!

À Dra. Anna Kohn, por me acolher em seu laboratório com tanto amor, e pelo estímulo e oportunidades dados, que foram importantes neste momento de conclusão de tese. Obrigada pelo apoio!

À Dra. Aleksandra Menezes de Oliveira, Alek, pela grande amizade e por estar sempre disposta a me ajudar, nos diferentes momentos que passamos juntas ao longo destes anos. Não tenho palavras para agradecer o companheirismo e as palavras de conforto nos momentos de crise.

Aos alunos do LBHOW pela eterna amizade: ao Eduardo pela ajuda ao longo destes anos, e principalmente pelos momentos Che Guevara do dia; à Vanessa (Vanish) pela sua dedicação e por liderar o “movimento pró-infectório” do laboratório nos meus momentos de ausência; ao Fernando pelos momentos “você sabia” da hora do almoço; à Vivi, pelo seu jeito doce e por cantar comigo; à Denise pelas gargalhadas na hora do almoço e pelas inúmeras histórias da vida real; à Tanny pelo movimento de multiplicação dos roedores; a Claudia Maia que, apesar de não ser oficialmente do nosso laboratório está constantemente conosco trazendo alegria, e por toda ajuda prestada; à Paloma, que apesar de ter saído do laboratório é insubstituível, não nos deixando esquecer da lan house, do orelhão e principalmente dos videoquês que ocorreram na casa da Rey. Amo vocês!

À Dra. Débora por toda amizade e apoio durante estes anos, e pelos “papos-cabeça” sobre a vida;

Ao Dr. Jairo que apesar de estar distante fisicamente mora em meu coração, e por todos os ensinamentos “jairianos” e “não-jairianos”;

Às pesquisadoras do Laboratório de Helminhos Parasitos de Peixes (IOC, FIOCRUZ) pela recepção agradável, e por em tão pouco tempo realmente me fazerem sentir parte deste time: à Dra. Simone Cohen pela amizade e companheirismo, e pelas idéias que me salvam nos momentos pré-congresso; à Dra. Berenice por nos divertir sempre, principalmente nos momentos Wanderley; à MSc. Márcia pelo seu jeito doce de ser e pelo carinho e à Dra. Maria Clara pela alegria e pelos ensinamentos nutricionais (que eu preciso por em prática!). Obrigada pelo apoio e paciência, principalmente nestes últimos meses de tensão-pré-tese!

À Mariana (Laboratório de Helminhos Parasitos de Peixes, IOC, FIOCRUZ) pela amizade e apoio nestes últimos meses.

Aos Professores do Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer, em especial ao Dr. Wanderley de Souza, por permitir a utilização dos equipamentos, e às Professoras Márcia Attias e Rossiane Vommaro por estarem sempre disponíveis a tirar minhas dúvidas.

Ao Corpo Técnico do Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer: Nete, Ana Cristina, Noêmia por serem tão solícitas, e ao Bosco e por sempre me ajudar a colocar nitrogênio líquido no microscópio;

Ao Paulinho, do Laboratório de Helminhos Parasitos de Peixes (IOC, FIOCRUZ) por estar sempre disponível e pelos milhares de favores ao longo destes meses;

Ao Dr. Marcos André Vannier, chefe do Laboratório de Biomorfologia-CPqGM-FIOCRUZ, por permitir a utilização dos equipamentos de seu laboratório em Salvador;

À Dra Adriana Lanfredi Rangel do Laboratório de Biomorfologia-CPqGM- FIOCRUZ, por me hospedar em sua casa com tanto carinho e por toda ajuda prestada na minha estadia em Salvador;

A todos os membros do Laboratório de Biomorfologia-CPqGM- FIOCRUZ, especialmente ao Cláudio, Glória, Elisângela e Carla por toda ajuda nos dias que passei em Salvador e por me receberem tão bem me fazendo sentir em casa;

À Dra Laís de Carvalho (Departamento de Histologia e Embriologia – Instituto de Biologia – UERJ) por permitir a utilização dos equipamentos de seu laboratório, e especialmente ao Alan, pela disponibilidade, ajuda e bom humor;

À Dra. Cláudia Portes Santos pela preciosa orientação na Iniciação Científica e pelos primeiros ensinamentos helmintológicos que fizeram com que hoje estivesse aqui;

Ao Dr. Arnaldo Maldonado e ao Dr. Paulo Sérgio D`Andréa pela orientação no PROVOC (Projeto de Vocação Científica) - Fiocruz, do qual participei ainda no 2º grau, e que sem dúvida me despertou para a ciência;

À Sandrinha, secretária da pós-graduação do IBCCF, por tirar minhas dúvidas e atender as minhas solicitações com tanta atenção e eficiência ao longo destes anos, mas principalmente nos últimos meses;

Aos meus avós Nelson e Edna, tão preciosos pra mim, por todo amor e por estarem sempre na torcida ao longo destes anos;

Ao Léo, meu irmão, por me ensinar a não levar a vida tão a sério, afinal, no fim tudo dá certo... obrigada pelo seu jeito “zen” de ser!

À Tia Nara por ser sempre tão presente e tão amável;

À Sandra e ao Anderson, meus amados pastores, pelo amor, amizade e apoios prestados a cada instante, e por se alegrarem tanto com minhas conquistas, estarem ao meu lado nos momentos de lutas, e me mostrarem que nunca estou sozinha;

À Gabi, Gislene, Aline, Renata, Eliz, Carla, Kátia, Adriana, Desirée, Ana Lang, Andréa, Lú, Agatha, Dani, Vivi e Monique por toda amizade, amor, carinho, por pagarem o preço e estarem disponíveis nos meus momentos de ausência. Amo vocês!

À Claudia Calvet (Claudinha) pela preciosa amizade de tantos anos e por estar presente em todos os momentos da minha vida. Obrigada por tudo!

À todos que estiveram ao meu lado nestes últimos anos e que contribuiriam diretamente ou indiretamente com esta tese através de apoio e carinho!

RESUMO

O sistema reprodutor feminino do filarídeo *Litomosoides chagasfilhoi* e os efeitos de drogas filaricidas sobre esta espécie são descritos pela primeira vez por microscopia eletrônica de transmissão. O ovário é composto por oócitos primários envolvidos por uma simples camada de células epiteliais justapostas à lâmina basal. Os oócitos primários estão arrançados radialmente e estão centralmente conectados em torno da raquis. A parede uterina consiste de fibras musculares envolvidas por uma lâmina basal e por um epitélio abaixo desta lâmina. Espermatozóides aflagelados e amebóides estão presentes dentro da porção proximal do útero. Os zigotos são recobertos por uma casca de ovo eletrondensa bem definida. Na região média do sistema reprodutor das fêmeas há a presença de embriões. Estes embriões crescem e se diferenciam ao longo do útero e na região distal do sistema reprodutor da fêmea microfilárias em desenvolvimento são observadas. Uma característica importante de *L. chagasfilhoi* é a presença de *Wolbachia-like* no cordão hipodermal, nos oócitos, zigotos, embriões e microfilárias. Nematóides provenientes de roedores *Meriones unguiculatus* tratados com uma dose única via oral de albendazol não apresentaram nenhuma alteração na parede do corpo. As alterações ultraestruturais produzidas pelo tratamento com 40 mg de albendazol foram o maior número de invaginações de membrana no labirinto baso-lateral do epitélio uterino e a presença de figuras de mielina nesta região e a maioria dos embriões e microfilárias estavam desintegrados dentro do útero. Após o tratamento com 80 mg de albendazol todas as microfilárias observadas no interior do útero estavam completamente danificadas. Os nematóides submetidos à ação de 6 mg/kg ou 12 mg/kg de DEC demonstraram muitos embriões e microfilárias destruídos no interior do útero. Os nematóides submetidos à ação de 6 mg/kg de DEC co-administrados com 40 mg de albendazol ou 12 mg/kg de DEC co-administrados com 80 mg de albendazol apresentaram alterações na hipoderme e no cordão hipodermal, na região não-contrátil da camada muscular e muitos zigotos, embriões e microfilárias estavam completamente degenerados. O presente estudo contribui para o conhecimento dos efeitos de DEC, albendazol e da co-administração destas duas drogas nos filarídeos, e enfatiza o potencial embriotóxico e microfilaricida destas duas drogas. A presença de *Wolbachia-like* está sendo referida pela primeira vez nesta espécie, mostrando a importância deste modelo de estudo experimental.

ABSTRACT

The female reproductive system of the filariid *Litomosoides chagasfilhoi* and the effects of filaricid drugs on this species are described for the first time by transmission electron microscopy. The ovary is composed by primary oocytes surrounded by a single layer of epithelial cells aposed on the basal lamina. The primary oocytes are arranged radially and are centrally connected around the rachis. The uterine wall consists of muscular fibers surrounded by a basal lamina and the epithelium underlying this lamina. Ameboid and aflagellate spermatozoa are present inside the proximal portion of the uterus. An electrondense well-defined eggshell covers the zygotes. In the middle region of females reproductive system there are many embryos. These embryos grow and differentiate along the uterus and in the distal region of female reproductive system, the final microfilariae development can be observed. An important feature of *L. chagasfilhoi* is the presence of *Wolbachia-like* in the hypodermal cord, oocytes, zygotes, embryos and microfilariae. Rodents *Meriones unguiculatus* treated with a single-oral dose of albendazole presented no alterations in the body wall. The ultrastructural alterations produced by treatment with 40mg of albendazole were the higher number of membrane invaginations in the basal labyrinth of the uterine epithelium and the presence of myeline figures in this region, and most embryos and microfilariae were damaged inside the uterus. After the treatment with 80 mg of albendazole all the microfilariae observed inside the uterus were completely damaged. The nematodes submitted to the action of 6 mg/kg or 12 mg/kg of DEC demonstrated many embryos and microfilariae destructed inside the uterus. The nematodes submitted to the action of 6 mg/kg of DEC plus 40 mg of albendazole or 12 mg/kg of DEC plus 80 mg of albendazole demonstrated alterations in the hypodermis and hypodermal cord, in the non-contractile region of muscle cell and many zygotes, embryos and microfilariae were completely degenerated. The present study contributes to the knowledge of the effects of DEC, albendazole and the co-administration of these two drugs in filariids, and emphasizes the embryotoxic and microfilaricidal potencial of these drugs. The presence of *Wolbachia-like* is reported for the first time in this species, showing the great importance of this experimental model of study.

ÍNDICE

1. Introdução.....	1
1.1 Filo Nematoda.....	1
1.2 Importância dos nematóides.....	1
1.3 Morfologia.....	4
1.3.1 Cutícula.....	4
1.3.2 Composição da cutícula	9
1.3.3 Hipoderme.....	9
1.3.4 Musculatura.....	10
1.3.5 Sistema Reprodutor.....	13
1.3.5.1 Sistema Reprodutor Masculino.....	13
1.3.5.2 Sistema Reprodutor Feminino.....	13
1.3.6 Microfilárias.....	15
1.4 Bactérias Intracelulares de Nematoda	17
1.5 Classificação Taxonômica.....	19
1.6 Ciclo de vida.....	24
1.7 Tratamento.....	26
1.7.1 Albendazol.....	27
1.7.2 Dietilcarbamazina (DEC).....	28
2. Objetivos.....	34
3. Material e Métodos.....	36
3.1 Infecção Experimental de Roedores da Espécie <i>Meriones unguiculatus</i>	36
3.2 Diagnóstico e análise da microfilaremia.....	36
3.3 Tratamento dos roedores.....	33
3.4 Obtenção de vermes adultos.....	37
3.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	37
4. Resultados.....	39
4.1 Ultraestrutura das fêmeas de <i>Litomosoides chagasfilhoi</i>	39
4.1.1 Parede do corpo.....	39
4.1.2 Sistema reprodutor.....	40
4.1.3 Parede Intestinal.....	43

4.1.4 Bactérias Intracelulares de Nematoda.....	43
4.2 Tratamento com albendazol.....	43
4.3 Tratamento com dietilcarbamazina (DEC)	46
4.4 Tratamento com a co-administração de dietilcarbamazina + albendazol.....	48
4.5 Comparação dos efeitos das drogas.....	51
5. Discussão.....	88
6. Conclusões.....	103
7. Referências.....	105
8. Artigo em anexo.....	131

1. INTRODUÇÃO

1.1 Filo Nematoda

O Filo Nematoda é constituído por organismos que ocupam quase todos os habitats. A maioria é de vida livre, vivendo em ambientes terrestres e aquáticos e uma minoria é parasita de animais e plantas. Os nematóides são organismos cilíndricos, alongados, afilados em ambas as extremidades e de simetria bilateral. Possuem dimorfismo sexual, sendo as fêmeas maiores que os machos (Roberts & Janovy, 1996; Rey, 2001).

1.2 Importância dos Nematóides

Embora em sua grande maioria os nematóides sejam organismos de vida livre, alguns são importantes agentes de infecção humana e veterinária e outros são responsáveis por grandes prejuízos na agricultura. Do ponto de vista médico e social, é notório o fato de que estes organismos constituem uma séria ameaça à saúde pública e ao bem estar da humanidade, além de prejudicarem o desenvolvimento econômico, devido à redução da produtividade ou mesmo à incapacitação para o trabalho (Walsh & Warren, 1979).

Crompton (1999) estimou que, numa população mundial de cerca de 5.753 bilhões de pessoas, havia a presença de aproximadamente 4.457 bilhões de infecções por helmintos. Considerou ainda que das 342 espécies de helmintos parasitando humanos, 138 pertenciam ao Filo Nematoda, demonstrando que os nematóides têm ocupado o primeiro lugar nas infecções humanas.

As infecções por helmintos aumentam e persistem em comunidades onde as condições de moradia, educação e saúde são precárias, não há esgoto sanitário e a renda por pessoa é baixa. Nos países em desenvolvimento, a urbanização e a migração da população rural pobre para as cidades pode levar à reduções no número de infecções por ancilostomídeos e oncocercose. No entanto, há um aumento do risco de adquirir infecções por *Ascaris lumbricoides* L., 1758, *Trichuris trichiura* L., 1771 e *Wuchereria bancrofti* Cobbold, 1877 (Crompton, 1999).

A maioria dos nematóides filarídeos não apresenta importância médica ou econômica apenas, mas alguns causam as mais trágicas, horríveis e debilitantes doenças no mundo hoje. Entre estas espécies podemos citar *W. bancrofti*, *Brugia malayi* Brug, 1927, *Onchocerca volvulus* Raillet & Henry, 1910 e *Loa loa* Guyot, 1778 (Roberts & Janovy, 1996).

A filariose linfática humana, que é causada pelos helmintos *W. bancrofti* (90% dos casos) e por *B. malayi* (10% dos casos), afeta aproximadamente 120 milhões de pessoas, sendo que um bilhão corre o risco de ser infectada (Michael & Bundy, 1997). A filariose linfática tem sido identificada pela Organização Mundial de Saúde como a segunda principal causa de incapacidade permanente e de longo prazo do mundo (WHO, 1997 a, b). Além dos problemas médicos, há várias consequências sociais e psicológicas, especialmente em pessoas que sofrem de elefantíase ou hidrocele (Bandyopadhyay, 1996; Dreyer *et al.*, 1997; WHO, 1997a). A filariose linfática também apresenta um grande impacto econômico nas comunidades endêmicas. Além dos custos diretos incluídos em tratamentos médicos ou cirúrgicos, há enormes custos indiretos resultantes da reduzida capacidade de trabalho e perda trabalhista (WHO, 1997a).

B. malayi parasita humanos na China, Coréia, Japão, sudeste de Ásia, Índia, Sri Lanka e Filipinas. *W. bancrofti* ocorre na África Central, Turquia, Índia e sudeste asiático, Filipinas e Ilhas oceânicas, Austrália e parte da América do Sul. Esta doença provavelmente entrou no novo mundo com o tráfico de escravos africanos durante o período colonial (Laurence, 1989). O parasito tendo encontrado no Brasil um bom vetor (*Culex quinquefasciatus* Say), além de condições climáticas apropriadas, aqui se adaptou e dispersou (Rachou, 1956).

No Brasil, focos da filariose bancroftiana são encontrados em Pernambuco e Alagoas, estimando-se em 49 mil o número de infectados (WHO, 2000a). E, apesar da mortalidade não estar associada à doença, a morbidade devido às manifestações clínicas é altamente significativa (Partono, 1985). A apresentação clínica da filariose é bastante diversificada e depende, entre outros fatores, do estágio do parasito envolvido e da resposta imunológica do paciente (Dreyer *et al.*, 1997).

A pesquisa das filarioses humanas envolve várias dificuldades, não só as de caráter ético, mas também relacionadas ao seu ciclo biológico. Um aspecto importante relaciona-se à pesquisa em pessoas naturalmente infectadas, pois se torna impossível determinar a idade da infecção, o número de filarídeos adultos presentes, o número de infecções sofridas pelo hospedeiro e a presença de infecções prévias com outros helmintos, impedindo estudos sobre a resposta imunológica específica. Muitas destas questões podem ser resolvidas através da utilização de modelos experimentais, o que permite o estudo de diferentes estádios larvares do parasito e sua interação com o hospedeiro. Estes modelos são de grande importância no desenvolvimento de drogas filaricidas, bem como para a compreensão dos aspectos da relação parasito-hospedeiro. Algumas espécies da família Onchocercidae, como as do gênero *Litomosoides*, foram

descritas parasitando naturalmente roedores e são utilizadas em larga escala como modelos experimentais (Franz *et al.*, 1987; Franz *et al.*, 1990; Moraes-Neto *et al.*, 2006).

1.3 Morfologia

O corpo dos nematóides é coberto por uma cutícula não celular, que é secretada pela hipoderme e é trocada quatro vezes durante a ontogenia (Roberts & Janovy, 1996). Esta cutícula, juntamente com a hipoderme e com a camada muscular constitui a parede do corpo que delimita uma cavidade pseudocelomática preenchida por líquido, onde se encontram os órgãos mergulhados (Wright, 1987) (Esquema 1).

1.3.1 Cutícula

Os nematóides são recobertos externamente pela cutícula, uma estrutura extracelular de múltiplas camadas que envolvem completamente o animal (Cox *et al.*, 1981). A cutícula é uma matriz extracelular rica em colágeno, que age como um exoesqueleto (Wright, 1987), além de ser a principal interface do nematóide com o meio ambiente (Politz & Philipp, 1992).

A superfície dos parasitos parece ser especialmente importante na estreita relação que há entre estes organismos e seus hospedeiros (Mackenzie *et al.*, 1978). No caso dos Nematoda, a cutícula apresenta funções básicas importantes, como sua capacidade de proteger os organismos da desidratação, abrasão, predação (nas espécies de vida livre) e do ataque imunológico (em espécies parasitas) (Maizels *et al.*, 1993).

A cutícula das diferentes espécies de nematóides possui tipicamente quatro camadas: a epicutícula, a camada cortical, a camada média e a camada fibrosa (Thompson & Glary, 1995).

A epicutícula, face externa da cutícula, tem de 6 a 30 nm, é rica em lipídeos (Maizels *et al.*, 1993; Thompson & Glary, 1995). Devido ao seu aspecto trilaminar em micrografias eletrônicas de transmissão, esta camada foi chamada de “membrana” por Lee (1965). Mais tarde, Lee (1977) se referiu a esta superfície como uma “membrana celular modificada”. Wright (1987) definiu epicutícula como sendo uma estrutura de conteúdo lipídico de aspecto trilaminar presente na superfície dos nematóides, chegando assim a um consenso.

Estudos utilizando a técnica de congelamento rápido e criofatura seguida de “deep-etching” permitiram a visualização da epicutícula de forma muito similar ao das membranas biológicas, uma vez que há duas faces de fratura nesta camada (Peixoto & De Souza, 1994; Martinez & De Souza, 1995). No entanto, por microscopia eletrônica de transmissão, esta epicutícula se apresenta heptalaminar na microfilária de *W. bancrofti* (De Souza *et al.*, 1989), pentalaminar na microfilária de *Brugia pahangi* Buckley & Edeson 1956 (Sayers *et al.*, 1984), e como uma única lâmina em adultos de *W. bancrofti* (Araújo *et al.*, 1995).

Associado à epicutícula há um invólucro adicional, o glicocálice, uma camada superficial rica em carboidratos, que é mais amorfa e evanescente que a epicutícula, e que apresenta uma espessura de 5 a 20 nm, dependendo da espécie. Em muitos casos, é este invólucro eletrondenso externo, ao invés da cutícula, que está envolvido na evasão do sistema imune do parasito. Em espécies de vida livre, o glicocálice tem como principal função promover a lubrificação e proteção contra abrasão, desidratação e

predação. Na maioria das espécies parasitas há um espaço de 10 nm separando esta camada da epicutícula (Blaxter *et al.*, 1992). Em alguns nematóides a camada superficial é visível em preparações de rotina, como é o caso de *Strongyloides venezuelensis* Brumpt, 1934 (Martinez & De Souza, 1995) e *Nippostrongylus brasiliensis* (Travassos, 1914) (Lee *et al.*, 1993).

Métodos para detecção de carboidratos tais como contrastação utilizando vermelho de rutênio e técnica do ácido periódico-tiosemicarbazida-proteinato de prata têm sido realizadas em nematóides como *Trichinella spiralis* (Owen, 1835) (Wright & Hong, 1988), *Trichinella nativa* (Britov & Boev, 1972) e *Trichinella pseudospiralis* (Garkavi, 1972) (Hulinska & Shaihenov, 1982), *Toxocara canis* (Werner, 1782) (Page *et al.*, 1992), *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856) (Cherian *et al.*, 1980) e em larvas infectantes de *Strongyloides venezuelensis* (Martinez & De Souza, 1997), indicando que a camada superficial é geralmente glicosilada. Além destas técnicas, a técnica de ferritina cationizada também tem sido empregada em diversos nematóides, tais como *Caenorhabditis elegans* (Zuckerman *et al.*, 1979; Peixoto & De Souza, 1992), *Caenorhabditis briggsae* (Himmeloch *et al.*, 1977; Zuckerman *et al.*, 1979) e microfilaria de *W. bancrofti* (De Souza *et al.*, 1989), demonstrando que a camada superficial é negativamente carregada.

Abaixo da epicutícula, há a camada cortical, que é amorfa e eletrondensa e possui uma proteína chamada cuticulina (Thompson & Glary, 1995). Tal proteína é resistente à solubilização por dodecil sulfato de sódio (SDS) e agentes redutores como o 2-mercaptoetanol (Politz & Philipp, 1992; Maizels *et al.*, 1993). Muitas vezes esta camada é dividida em uma região externa e outra interna (Ruppert & Barnes, 1996). A camada média é um compartimento preenchido por fluido, e também pode conter finas

fibras de colágeno (Thompson & Glary, 1995). A camada fibrosa contém fibras de colágeno em um arranjo helicoidal cruzado que se espiralam em torno do nematóide a um ângulo de cerca de 75° em relação ao eixo longitudinal, variando de acordo com a espécie (Thompson & Glary, 1995). Tais colágenos são solubilizados a partir da cutícula apenas com ajuda de agentes redutores de pontes de dissulfeto, como o 2-mercaptoetanol (Politz & Philipp, 1992).

A cutícula de adultos de *Litomosoides carinii* Travassos, 1919 apresenta, além da epicutícula trilaminada, quatro subcamadas. Uma camada mais externa homogênea, e que limita as estriações cuticulares; uma segunda camada mais eletróluscente; uma camada eletróluscente que apresenta finas fibras orientadas circularmente ao eixo principal do nematóide e, por último, uma camada mais interna, que é espessa e está intimamente associada com a hipoderme subjacente, da qual é separada por membranas altamente convolutas. Estas membranas podem atravessar toda a hipoderme e entrar em contato com a lâmina basal que circunda as células musculares, fornecendo assim sustentação estrutural (Franz & Andrews, 1986; Storey & Ogbogu, 1991).

A cutícula de *Litomosoides chagasfilhoi* Moraes-Neto, Lanfredi & De Souza, 1997 se caracteriza pela presença de uma epicutícula trilaminada e pelas camadas cortical, intermediária, fibrosa e basal. As estriações cuticulares estão limitadas à camada cortical, a qual é relativamente homogênea. A camada intermediária é relativamente eletróluscente, e a camada fibrosa é a camada mais espessa e eletróluscente. A camada basal, mais interna, está intimamente associada à hipoderme, onde é possível observar diversas fibras e mitocôndrias (Moraes-Neto *et al.*, 2002, 2003).

Réplias observadas através da técnica do congelamento rápido e criofratura seguida de “deep-etching” permitiram a observação de detalhes da arquitetura das camadas cuticulares de *L. chagasfilhoi* que não puderam ser visualizadas por microscopia eletrônica de transmissão. A camada cortical é formada por uma rede de fibras e por partículas globulares; a camada intermediária possui uma rede de fibras com orientação longitudinal; a camada fibrosa apresenta fibras finas e grossas, as quais estão conectadas umas às outras de um modo particular e com uma orientação diferente da observada na camada intermediária; a camada basal também é composta por fibras e está intimamente associada com a hipoderme. Atravessando as camadas cuticulares foi possível observar canais, os quais eram mais evidentes na camada fibrosa e aparentemente conectavam a epicutícula à camada muscular, passando pela hipoderme. Vários poros foram observados ao longo destes canais (Moraes-Neto *et al.*, 2002).

A técnica de congelamento rápido e criofratura seguida de “deep-etching” tem sido utilizada em diversos nematóides, tais como *Strongyloides venezuelensis* (Martinez & De Souza, 1995), *Caenorhabditis elegans* (Peixoto *et al.*, 1997) e *Hassalstrogylus epsilon* (Oliveira-Menezes *et al.*, 2003) e tem revelado uma arquitetura cuticular formada por uma rede de fibras.

A observação de microfilárias de *L. chagasfilhoi* por microscopia eletrônica de transmissão mostrou que a bainha desta larva apresenta tipicamente três camadas: uma camada mais interna, moderadamente eletrondensa e em contato com o espaço que envolve a epicutícula da microfilária; uma camada eletróluscente intermediária; e uma camada mais externa densa e homogênea. Réplias de criofratura mostraram a presença de partículas formando a bainha. Contudo, uma estrutura bilaminada foi observada em tais réplias, a camada interna com uma superfície formada por partículas globulares

arranjadas firmemente, enquanto a camada mais externa era relativamente lisa. O espaço entre a bainha e a cutícula apresentou uma rede de fibras que conectavam a camada interna da bainha à sua superfície (Moraes-Neto *et al.*, 2001).

1.3.2 Composição da Cutícula

A cutícula dos nematóides é uma estrutura extracelular composta primariamente de proteínas além de pequenas quantidades de lipídios e carboidratos (Fetterer & Rhoads, 1993).

Três categorias de componentes de proteínas cuticulares têm sido identificadas (Politz & Philipp, 1992): 1) colágenos, que são solubilizados apenas com ajuda de agentes redutores de pontes de dissulfeto tais como 2-mercaptoetanol e os quais são hidrolizados por colagenase; 2) cuticulina, que é o material que permanece após tratar a cutícula com o detergente desnaturante SDS e β -mercaptoetanol; 3) proteínas e glicoproteínas presentes no glicocálice que reveste a epicutícula.

Os lipídios, como já dito, têm sido observados na epicutícula de diversos nematóides (Proudfoot *et al.*, 1990; Proudfoot *et al.*, 1991).

1.3.3 Hipoderme

Proteínas cuticulares estruturais, tais como colágenos, são sintetizadas e secretadas a partir da hipoderme (Cox, 1990). A hipoderme é um sincício que forma uma camada imediatamente abaixo da cutícula e é especializada para o transporte e secreção. Constituintes tipicamente citoplasmáticos estão uniformemente distribuídos

nesta camada. A face exterior da membrana hipodermal provavelmente representa a verdadeira membrana limitante dos nematóides (Thompson & Glary, 1995) (Esquema 1).

Uma característica constante da hipoderme dos nematóides é a sua expansão na direção da cavidade pseudocelomática para formar cristas ao longo das linhas meio-dorsal, meio-ventral e meio-lateral do corpo. Podem haver quatro ou mais cristas chamadas de cordões hipodermis que se estendem por todo o comprimento do corpo. Os núcleos epidérmicos restringem-se a esses cordões (Ruppert & Barnes, 1996). A hipoderme é responsável por sintetizar a cutícula durante o desenvolvimento e pelo crescimento que ocorre após a quarta muda (Watson, 1965; Lumsden, 1975; Wright, 1987). Além disso, ela armazena nutrientes e possui fibras que ligam a musculatura à cutícula (Ruppert & Barnes, 1996).

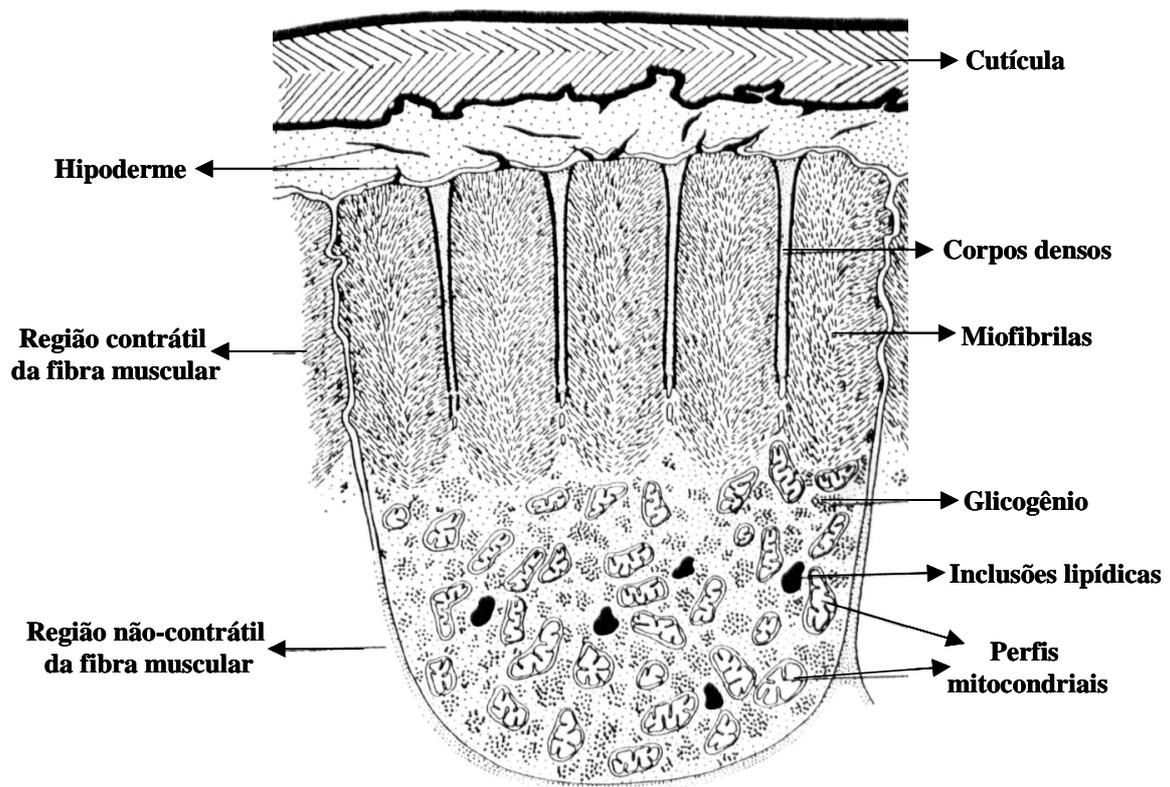
1.3.4 Musculatura

Abaixo da hipoderme encontramos a musculatura somática, que também faz parte da parede do corpo. A musculatura somática e o pseudoceloma, contendo o líquido pseudocelomático, juntamente com a cutícula, funcionam como um esqueleto hidrostático (Roberts & Janovy, 1996). A camada muscular é composta por fibras longitudinais, que se estendem ao longo de todo o corpo do nematóide e se localizam nos quatro quadrantes entre os cordões hipodermis (Ruppert & Barnes, 1996). A célula muscular possui uma porção contrátil composta por fibrilas contráteis adjacentes a hipoderme e a porção não contrátil ou miócito de mesmo comprimento, interiorizado no

pseudoceloma. No miócito localizam-se os núcleos, mitocôndrias, ribossomos, retículos endoplasmáticos, glicogênio e lipídio (Roberts & Janovy, 1996) (Esquema 1).

Rosenbluth (1965) estudou a musculatura de *Ascaris lumbricoides* por microscopia eletrônica de transmissão e verificou que as fibras musculares são, de fato, comparáveis a musculatura estriada dos vertebrados, com filamentos grossos de miosina e filamentos finos de actina. As bandas H, A e I estão presentes, mas as linhas Z estão ausentes. No entanto, as estriações não são transversais, mas oblíquas, formando um ângulo de 6° com o eixo do filamento. Por isso, a musculatura é dita “obliquamente estriada”. Uma característica da musculatura estriada oblíqua dos nematóides é a ligação direta a cada corpo denso, e então de cada sarcômero, à membrana da célula muscular, o que não é observado nos vertebrados (Burr & Gans, 1998).

Atualmente, a superfície dos Nematoda tem sido mais estudada do que a de outros helmintos dada a sua importância patogênica e seu grande interesse econômico (Thompson & Glary, 1995).



Esquema 1: Parede do corpo do Filo Nematoda sendo composta por uma cutícula, uma hipoderme e uma camada muscular (Adaptado de Lee, 1965. *Parasitology* 55: 173-181).

1.3.5 Sistema Reprodutor

O estudo do sistema reprodutor de filarídeos é uma ferramenta importante para a compreensão da oogênese, fertilização e desenvolvimento dos nematóides, além de permitir o melhor entendimento de ação de drogas. Contudo, poucos estudos têm sido realizados neste assunto a níveis ultraestruturais (McLaren, 1973; Rogers *et al.*, 1976).

1.3.5.1 Sistema Reprodutor Masculino

O sistema reprodutor masculino é tubular, formado pelo testículo, vesícula seminal e vaso deferente. O testículo é subdividido em duas regiões, uma zona germinal, onde ocorrem as divisões das espermatogônias e uma zona de crescimento. A zona de crescimento tem a forma de um cordão com células conectadas radialmente a uma estrutura denominada raquis. No final da zona de crescimento há uma estrutura tubular, a vesícula seminal, que é responsável por estocar os espermatozóides. O vaso deferente é um ducto que separa a zona de crescimento do testículo da vesícula seminal. Ele é dividido numa região anterior glandular, e numa região posterior muscular, o ducto ejaculatório, que se abre na cloaca (Chitwood, 1974; Roberts and Janovy, 1996).

1.3.5.2 Sistema Reprodutor Feminino

O sistema reprodutor feminino dos nematóides é tubular, formado pelo ovário, oviduto, útero, vagina e vulva. Sabe-se que o ovário consiste de um saco tubular formado por uma camada epitelial e por um cordão germinal, sendo composto por uma zona germinal e por uma zona de crescimento (Chitwood, 1974). A região posterior do ovário dos nematóides é ocupada por um sincício vacuolizado contendo mitocôndrias

arredondadas, enquanto oogônias de formato irregular se desenvolvem no sincício (McLaren, 1973).

Estas oogônias sofrem divisões mitóticas rapidamente resultando em oócitos primários que são muito numerosos e preenchem completamente o lúmen do ovário. Estes oócitos contêm um núcleo grande e arredondado, e um denso nucléolo. O citoplasma é granular e contém ribossomos, mitocôndria, retículo endoplasmático e complexo de Golgi (McLaren, 1973).

Na região de crescimento do ovário, os oócitos se tornam células ainda maiores, apresentando um núcleo com grande e denso nucléolo. Estes oócitos são organizados em torno de um eixo central chamado de raquis, se ligando a ela através de pontes citoplasmáticas. A raquis é uma massa sincicial não nucleada. Os oócitos primários se desprendem então da raquis e passam através do oviduto para um canal de fertilização (McLaren, 1973; Prestage, 1960; Lee & Lestan, 1971).

O canal de fertilização é preenchido por oócitos e espermatozóides maduros. Em *Dipetalonema vitae* Krepkogorskaya, 1933 quando a região anterior granular dos espermatozóides faz um primeiro contato com o oócito causa uma invaginação no oolema (McLaren, 1973). O efeito imediato da fertilização do oócito é a produção de uma segunda unidade de membrana além do oolema (Lee & Lestan, 1971).

O zigoto de *D. vitae* é uma célula alongada com citoplasma granular contendo ribossomos, mitocôndrias e núcleo. Este zigoto começa então a sofrer clivagens se tornando um embrião multicelular que continua seu desenvolvimento até formar microfírias no útero e estas são encaminhadas para a vagina (McLaren, 1973).

O útero é a parte mais longa do trato reprodutivo, sendo formado por uma camada muscular de fibras circulares e oblíquas que estão embebidas numa lâmina

basal, e por um epitélio celular (Chitwood, 1974; Franz, 1988; Pilakasiri *et al.*, 2005). No seu interior pode-se observar diferentes etapas do desenvolvimento, desde zigoto (célula fecundada com casca de ovo), embrião (várias células em divisão com casca de ovo) até microfilária, que é uma larva de primeiro estágio que pode estar envolta por uma bainha.

1.3.6 Microfilárias

Em algumas espécies de filarídeos as microfilárias são envolvidas por uma fina membrana ovular frouxa denominada bainha. Abaixo da bainha, a microfilária apresenta uma cutícula e, sob a cutícula, há a presença de células sub-cuticulares que formarão a hipoderme e a musculatura, enquanto as células somáticas constituirão o tubo digestivo e outros órgãos do verme adulto. O poro excretor e o anel nervoso são observados numa região mais clara, sem núcleos. O poro genital é posterior e na região terminal da cauda são encontradas células germinativas que correspondem aos primórdios do aparelho genital (Manson-Barh, 1952) e não apresentam pseudoceloma (Laurence & Simpson, 1971).

A maioria das espécies de microfilárias é envolta por uma bainha que tem origem embrionária, surgindo das membranas dos oócitos (casca de ovo) (Rogers *et al.*, 1976; Ellis *et al.*, 1978; Furhrman & Piessens, 1985). Embora a bainha tenha uma origem embrionária, ela se difere da casca do ovo em estrutura e composição (Schraermeyer *et al.*, 1987a, b). Foi observado em *L. carinii* e em *B. malayi* que a quitina está presente na casca do ovo que envolve zigotos, mas está ausente em microfilárias mais maduras. A degradação da quitina neste estágio de desenvolvimento

provavelmente ocorre para que seja possível o alongamento e a elasticidade da bainha da microfilária (Schraermeyer *et al.*, 1987a). Acredita-se que as mudanças de composição da bainha durante o desenvolvimento da microfilária possam ser o resultado da incorporação de produtos secretados da hipoderme, o qual atravessa a cutícula e se acumula adjacientemente à porção interna da bainha (Araújo *et al.*, 1994).

A bainha é uma estrutura composta de diferentes camadas as quais envolvem todo o corpo da microfilária de forma frouxa. Ela está presente apenas neste estágio de algumas espécies de filária, como *L. loa*, *L. carinii*, *L. chagasfilhoi* e *W. bancrofti*. Em algumas espécies têm-se observado que a bainha é separada da parede do corpo da microfilária por um espaço que contém material heterogêneo, enquanto em outras espécies esta bainha mantém um contato com o corpo da microfilária (McLaren, 1972; Lawrence & Simpson, 1974; Tongu, 1974; De Souza *et al.*, 1989; Moraes-Neto *et al.*, 2001).

O estudo ultraestrutural de *L. loa* e *L. carinii* demonstrou que a bainha é composta por uma camada uniforme de material eletrondenso, não limitado por membranas. Além disso, a observação das microfilárias no útero de espécies destinadas a estar desembainhadas no sangue demonstrou que cada microfilária é envolvida por uma bainha típica (McLaren, 1972).

Estudos prévios têm demonstrado que a bainha de *W. bancrofti* é formada por pelo menos quatro camadas bem definidas, enquanto em *B. malayi* há apenas duas camadas (De Souza *et al.*, 1989).

Acredita-se que a bainha e a epicutícula são de grande importância na interação parasito-hospedeiro. Estas estruturas parecem estar envolvidas no processo de evasão do sistema imune (Klonisch *et al.*, 1991). Estudos têm demonstrado a presença de

diferentes resíduos de carboidratos através do uso de lectinas em diferentes espécies de microfilárias (Araújo *et al.*, 1993, 1994; Shraermeyer *et al.*, 1987b).

1.4 Bactérias Intracelulares de Nematoda

Bactérias intracelulares de nematóides filariais foram descobertas nos anos 70, através da microscopia eletrônica por McLaren *et al.* (1975). Estes pesquisadores especularam que esta bactéria poderia se tratar da *Wolbachia* sp., simbiote de insetos vetores. Contudo, apenas em 1995 com o advento da biologia molecular, Sironi *et al.* (1995) identificaram a endobactéria presente em *D. immitis* como sendo do gênero *Wolbachia*.

Wolbachia sp. é uma bactéria da ordem Rickettsiaceae, e tem sido identificada na maioria das espécies de filarias, incluindo as principais espécies parasitas de humanos: *W. bancrofti*, *O. volvulus* e *B. malayi*. Contudo, esta bactéria não foi observada em *Acanthocheilonema vitae* (Weiss & Tanner, 1979), *Onchocerca flexuosa* Wedl, 1856, *L. loa* e *Setaria equina* (Abildgaard, 1789) (Taylor & Hoerauf, 1999; Hise *et al.*, 2004).

A bactéria pode ser detectada em todos os estádios de desenvolvimento do nematóide e é muito abundante em vermes adultos (Taylor & Hoerauf, 1999). Esta endobactéria está presente em vacúolos intracitoplasmáticos dos cordões hipodermis de machos e fêmeas, nos órgãos reprodutivos das fêmeas e nas microfilárias (Taylor & Hoerauf, 1999; Kramer *et al.*, 2003). Análises ultraestruturais indicam que esta endobactéria é arredondada, com cerca de 0,5 µm de diâmetro, e é envolvida por uma dupla membrana trilaminada e por um citoplasma contendo grânulos ribossomo-like (Peixoto *et al.*, 2001). Elas podem estar presentes em colônias e a observação das

bactérias em divisão no cordão hipodermal sugere que sua multiplicação ocorra neste momento (Taylor & Hoerauf, 1999).

Diversos estudos em vários modelos filariais têm demonstrado que o uso de antibióticos como tetraciclina e doxiciclina contra *Wolbachia* sp. pode afetar profundamente o desenvolvimento, a viabilidade e a fertilidade dos parasitos filariais (Taylor *et al.*, 2000a; Taylor & Hoerauf, 2001). Os maiores efeitos do tratamento com antibióticos são: (1) não ocorre muda da larva infectante para verme adulto; (2) incapacidade reprodutiva do nematóide (esterilização do verme adulto); (3) eventual perda da viabilidade, incluindo atividade adulticida (Taylor *et al.*, 2000a). Desta forma, estudos indicam que *Wolbachia* sp. é fundamental para o desenvolvimento e sobrevivência do nematóide filarídeo.

Estudos recentes com oncocercose humana demonstraram que o tratamento com doxiciclina pode eliminar *Wolbachia* sp., levando ao completo bloqueio da embriogênese e redução das microfilárias na pele após o tratamento com ivermectina (Hoerauf *et al.*, 2001).

Atualmente, tem sido demonstrado que uma potente atividade inflamatória dos nematóides filarídeos é mediada por uma atividade endotoxina-like derivada de bactérias simbióticas intracelulares (Taylor *et al.*, 2000b; Brattig *et al.*, 2000). A atividade endotoxina-like desta bactéria é mediadora da inflamação sistêmica após tratamento com ivermectina e também é responsável pela patogênese inflamatória de ceratite ocular em murinos utilizados como modelo da oncocercose (Saint Andre *et al.*, 2002).

Em filariose humana, a liberação da bactéria no sangue após o tratamento antifilarial dos vermes está fortemente associada com reações inflamatórias sistêmicas em

peessoas infectadas com *B. malayi* (Cross *et al.*, 2001). Isto sugere que na morte do nematóide, *Wolbachia* sp. é liberada no sangue e exposta ao sistema imune do hospedeiro. Produtos da bactéria também parecem ser liberados dos vermes vivos e são responsáveis pelo recrutamento de neutrófilos envolvendo o adulto *O. volvulus* (Brattig *et al.*, 2001). Isto confirma que os antígenos do endossimbionte são reconhecidos pela resposta imune e suportam a idéia de que a resposta imune a *Wolbachia* sp. pode contribuir para a patogênese filarial (Taylor, 2002).

Em vista da importância da *Wolbachia* sp. para a sobrevivência, desenvolvimento e patogênese do parasito linfático filarial no hospedeiro humano, uma nova estratégia quimioterapêutica utilizando antibióticos da classe tetraciclina deve ser investigada (Taylor & Hoerauf, 1999; Taylor *et al.*, 2000a). Além disso, estudos adicionais são necessários para que haja uma melhor compreensão da interação entre o nematóide e a bactéria.

1.5 Classificação Taxonômica

O Filo Nematoda se divide em duas grandes classes: Classe Adenophorea (=Aphasmida) e Classe Sercenentea (=Phasmida). A Classe Adenophorea contém nematóides que não apresentam fasmídeos (órgãos sensitivos localizados na região posterior do corpo). A maioria das espécies é de vida livre e apenas algumas são parasitas. As espécies de vida livre incluem formas terrestres e de água doce e quase todas as formas marinhas (Roberts & Janovy, 1996; Ruppert & Barnes, 1996).

A Classe Sercenentea ou Phasmida contém nematóides que possuem fasmídeos. A maioria das espécies parasitas faz parte desta classe além das espécies de vida livre

que habitam no solo. Nesta classe podemos encontrar quatro ordens principais: Ascaridida, Spirurida, Rhabditida e Strongylida (Ruppert & Barnes, 1996).

Os nematóides pertencentes à ordem Spirurida possuem um esôfago dividido em uma porção muscular anterior e uma porção glandular posterior (às vezes indistinto), sendo a região anterior mais curta que a posterior. Os estádios larvares se desenvolvem até a forma infectante (larva de 3º estágio) dentro de um hospedeiro intermediário (Chabaud, 1975). As superfamílias Acuarioidea, Camallanoidea, Diplotriaenoidea, Dracunculoidea, Filarioidea, Gnathostomatoidea, Habranematoidea, Physalopteroidea, Spiruroidea e Thelazioidea pertencem a esta ordem.

A superfamília Filarioidea abrange um grupo de organismos que invadem com sucesso a corrente sanguínea, o tecido conjuntivo ou a cavidade dos vertebrados. Todas as espécies são de importância médica ou veterinária e apresentam como hospedeiro intermediário um artrópode hematófago (Smith, 1992).

Na família Onchocercidae (Leiper, 1911) (= Dipetalonematidae (Wehr, 1935)) as fêmeas têm a vulva bem atrás do anel nervoso, os machos apresentam espículos de tamanhos e formas diferentes e o esôfago pode ser dividido ou não. As microfilárias são encontradas no sangue, linfa ou pele do hospedeiro. Os vetores são artrópodes hematófagos. Os nematóides desta família são parasitas de anfíbios, répteis, aves e mamíferos (Chabaud, 1975).

A subfamília Onchocercinae é caracterizada por uma cauda longa, não alada e espículos marcadamente desiguais (Chabaud, 1975). Diversos gêneros pertencem a esta subfamília, entre eles *Litomosoides*, *Wuchereria* e *Brugia*.

O gênero *Litomosoides* Chandler, 1931 inclui 28 espécies de parasitos presentes na cavidade torácica e/ou abdominal de morcegos, roedores, e marsupiais. Algumas

espécies foram descritas de roedores do Brasil, tais como *L. carinii* (Travassos, 1919) em *Sciurus* sp. Linnaeus, 1758; *Litomosoides silvai* Padilha & Faria, 1977 em *Akodon cursor* [syn. *A. arviculoides* (Winge, 1887)]; *Litomosoides legerae* Bain, Petit & Berteaux, 1980 em *Oxymycterus quaestor* (syn. *O. hispidus* Pictet, 1843); *Litomosoides galizai* Bain, Petit & Diagne, 1989 em *Oecomys trinitatis tapajinus* (Allen & Chapman, 1893); e *Litomosoides kohnae* Bain, Petit & Diagne, 1989 em *Nectomys squamipes* Brants, 1827.

Litomosoides chagasfilhoi (Nematoda: Filarioidea) foi descrito por Moraes-Neto *et al.* (1997) parasitando a cavidade abdominal de *A. cursor*, no Brasil. Este filarídeo apresenta um corpo branco, alongado e cilíndrico. A extremidade cefálica é arredondada, apresenta cutícula com padrão de labirinto, abertura oral simples, sem lábios, circundada por quatro papilas cefálicas internas e duas externas e dois anfídeos bem desenvolvidos. Há quatro papilas cefálicas internas e duas externas, dois anfídeos bem desenvolvidos, e alterações cuticulares formando um labirinto. A abertura oral é levemente deslocada do eixo principal do corpo. A cápsula bucal apresenta comprimento maior que a largura, tem paredes quitinosas finas, e a extremidade posterior está inserida na extremidade posterior bulbosa do esôfago. O esôfago não é dividido em duas porções. O corpo é cilíndrico, sendo mais estreito após a abertura cloacal dos machos e após o ânus das fêmeas, e termina em uma cauda alongada (Fig. 1).

Os machos apresentam espículos desiguais, sendo que o espículo maior apresenta um cabo mais longo que a lâmina e possui uma haste quitinizada; as bordas da primeira metade da lamina apresentam grandes asas membranosas, dobradas longitudinalmente e vistas claramente, mesmo sem dissecação. As asas se tornam mais

estreitas na segunda metade da lamina, a qual apresenta uma bainha muito mais longa que o espículo. O espículo direito não é bem quitinizado, possui uma extremidade estreita e com uma pequena porção lanceolada. A extremidade posterior do corpo é espiralada com 4 giros e apresenta 1 par de papilas ad-cloacais, 4 a 6 pares de papilas pós-cloacais e 1 papila ímpar subterminal (Moraes-Neto *et al.*, 1997) (Fig. 1).

As fêmeas apresentam uma vulva localizada após a junção esôfago-intestino sendo envolvida por um lábio anterior fino e por um posterior mais grosso. A terminação caudal é arredondada e apresenta um par de fasmídios. A fêmea é vivípara. As microfilárias apresentam bainha (Moraes-Neto *et al.*, 1997) (Fig. 1).

Deste modo, podemos classificar *Litomosoides chagasfilhoi* Moraes Neto, Lanfredi & De Souza, 1997 da seguinte forma:

Filo Nematoda

Classe Sercenentea (=Phasmida)

Ordem Spirurida

Superfamília Filarioidea Weinland, 1858

Família Onchocercidae (Leiper, 1911) (= Dipetalonematidae (Wehr, 1935))

Subfamília Onchocercinae Leiper, 1911

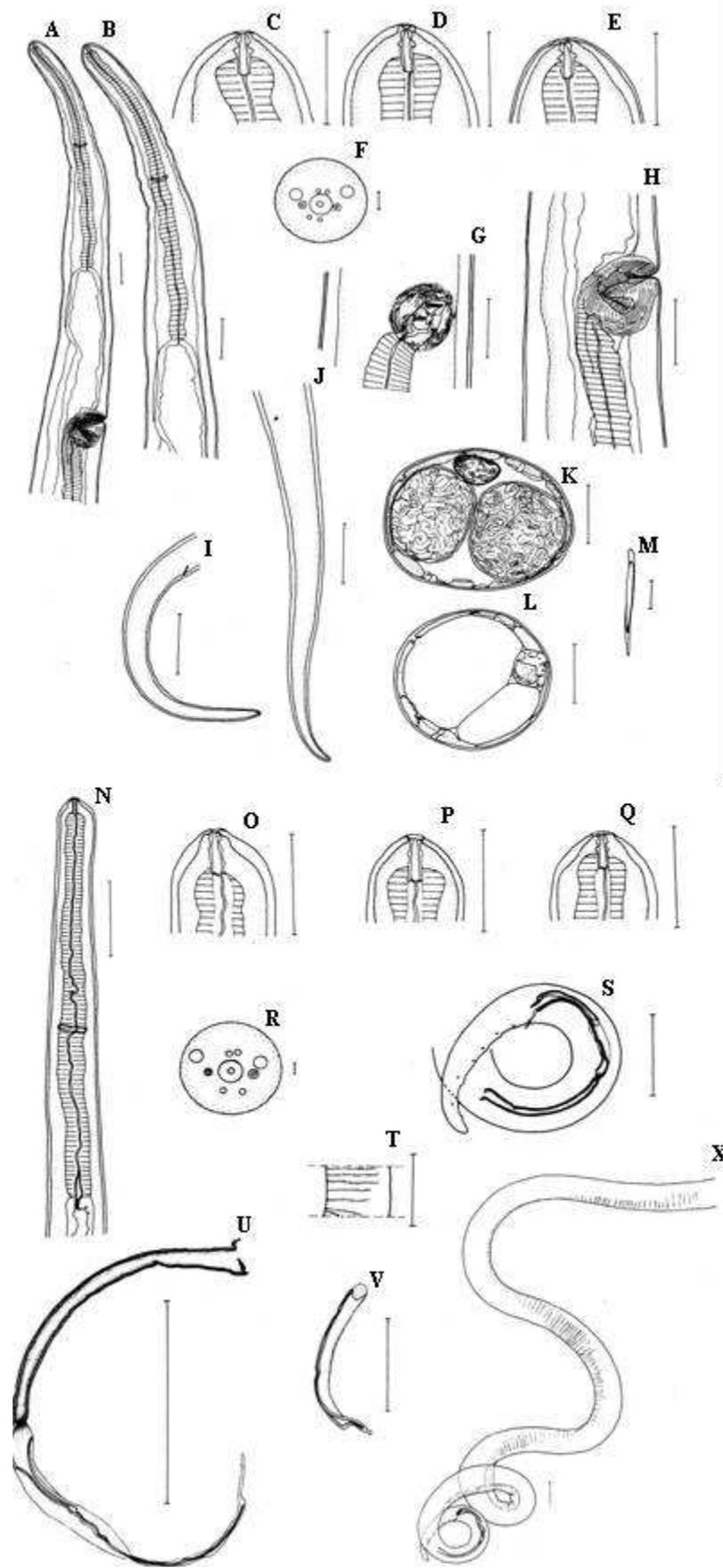
Gênero *Litomosoides* Chandler, 1931

Espécie *Litomosoides chagasfilhoi* Moraes Neto, Lanfredi & De Souza,
1997

Fig. 1: Microscopia de luz de *Litomosoides chagasfilhoi*.

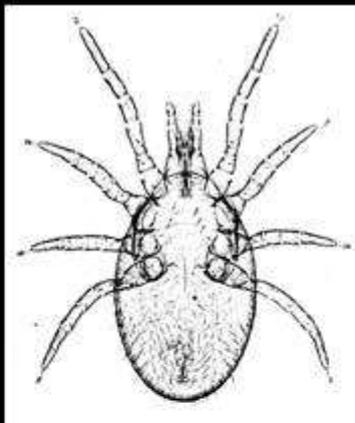
A-M: Fêmeas de *L. chagasfilhoi*: **A.** Região anterior; **B.** Região do esôfago; **C-E.** Cápsula bucal de 3 espécimes; **F.** Vista frontal da região anterior; **G, H.** Vulva, visões ventral e lateral, respectivamente; **I, J.** Cauda, visões lateral e ventral, respectivamente; **K.** Secção transversal abaixo da vulva; **L.** Secção transversal próximo à região posterior; **M.** Microfilária. Barras: A, B, G-L 100 µm; C-E 50 µm; F 5 µm; M 25 µm.

N-X: Machos de *L. chagasfilhoi*: **N.** Região anterior; **O-Q.** Cápsula bucal de 3 espécimes, vista lateral; **R.** Vista frontal da região anterior; **S.** Cauda com espículos direito e esquerdo, vista lateral; **T.** Detalhe da área rugosa presente na região posterior; **U.** Espículo esquerdo apresentando longas asas membranosas dobradas longitudinalmente; **V.** Espículo direito apresentando uma porção semelhante à “língua” na porção distal, visão lateral. **X.** Região posterior espiralada apresentando área rugosa e espículos, visão lateral. Barras: N, S, T, U, X 100 µm; O-Q, V 50 µm; R 2 µm.



1.6 Ciclo de Vida

Litomosoides spp. apresentam como hospedeiro invertebrado experimental o ácaro hematófago *Ornithonyssus bacoti* (Hirst, 1913). Este ácaro, ao realizar hematofagia, ingere as microfilárias, que perdem a bainha em poucas horas (Bertram *et al.*, 1946). Estas larvas perfuram a parede intestinal do ácaro e caem na hemocele, onde sofrem duas mudas, originando uma larva de 2º estágio (L₂) salsichóide e, em seguida, uma larva de 3º estágio (L₃) (Bertram *et al.*, 1946; Williams, 1948). As larvas de 3º estágio constituem a forma infectante para o hospedeiro invertebrado. O intervalo de tempo da ingestão das microfilárias à maturação das larvas infectantes é de 14 a 36 dias (Bertram, 1947; Bertram, 1965). Ao praticar hematofagia, as larvas infectantes presentes no ácaro penetram no roedor através da pequena lesão feita durante a alimentação. Na pele, as larvas penetram nos vasos sanguíneos periféricos e migram por quatro a seis dias para os locais de permanência definitiva (cavidade abdominal). Ao chegar na cavidade, ocorrem duas mudas que originam as larvas de 4º estágio e adultos jovens e finalmente os vermes se tornam adultos (Scott *et al.*, 1951; Bertram, 1965). As microfilárias liberadas pelas fêmeas adultas levam cerca de um dia para sair da cavidade abdominal e atingir a corrente sanguínea através dos pulmões ou do coração (Kershaw, 1949) (Esquema 2). O ciclo biológico experimental de *L. chagasfilhoi* é mantido no Laboratório de Biologia de Helmintos Otto Wucherer utilizando *Ornithonyssus bacoti* como hospedeiro intermediário experimental. O período pré-patente, ou seja, da infecção à detecção de microfilárias sanguíneas, para *L. chagasfilhoi* é de 65 a 75 dias.



1.7 Tratamento

Em 1997 a Organização Mundial de Saúde (OMS) decidiu adotar medidas para eliminar a filariose linfática como um problema de saúde pública (WHO, 1997a). Dentre as diversas medidas de controle da filariose, a mais eficaz é o tratamento em massa utilizando quimioterápicos, uma vez que desta forma todos os membros de uma comunidade com infecções no período pré-patente ou infecções patentes são tratados ao mesmo tempo (WHO, 1997 a, b).

Até pouco tempo, dietilcarbamazina (DEC) era o único fármaco utilizado (WHO, 1994). Contudo, uma combinação de 6 mg/kg de dietilcarbamazina e 400 mg de albendazol surgiu como uma alternativa adicional no tratamento da filariose (WHO, 2000 b). A marcante atividade microfilaricida destes dois fármacos faz deles adequados ao tratamento anual designado para controlar a transmissão imediata e, em longo prazo, prevenir a morbidade (Ottesen *et al.*, 1997). Entretanto, estes fármacos não devem ser administrados à crianças com menos de dois anos de idade, mulheres grávidas ou amamentando e à pessoas com sérias doenças agudas ou crônicas (WHO, 2000 b).

Em regiões da África onde *O. volvulus* ou *L. loa* são co-endêmicos com *W. bancrofti*, o uso de DEC precisa ser evitado, uma vez que este fármaco pode induzir sérias reações adversas pela rápida morte das microfíliárias destes dois outros filarídeos africanos (Ottesen, 1993).

Em pacientes tratados com uma dose única de DEC + albendazol, observou-se que além da significativa atividade microfilaricida, o nível de antígenos filariais circulantes provenientes de vermes adultos viáveis reduziu progressivamente (Ismail *et al.*, 1998).

Num estudo na Índia, após a administração de DEC sozinho (6mg/kg) e da co-administração de DEC (6 mg/kg) com albendazol (400 mg) em indivíduos com *W. bancrofti*, observou-se que a combinação dos dois fármacos reduziu a prevalência da microfilaremia em 61%, enquanto que os indivíduos tratados apenas com DEC apresentaram uma redução de apenas 36%. Deste modo, foi concluído que a dose única anual combinando DEC + ALB tem um efeito elevado contra microfilárias de *W. bancrofti* se comparado com a terapia que utiliza apenas um fármaco (Rajendran *et al.*, 2006).

A comparação da utilização de diferentes anti-helmínticos foi testada em grupos de indivíduos infectados por *Mansonella perstans* (Mansons, 1891). Apesar de DEC reduzir a microfilaremia na maioria dos casos, a infecção não foi eliminada, enquanto a utilização de mebendazol apresentou-se mais efetiva na redução da infecção. Contudo, a combinação DEC + mebendazol resultou em uma atividade mais significativa que o uso de apenas um fármaco sozinho (Bregani *et al.*, 2006).

Estudos *in vivo* com modelos experimentais podem elucidar muitos aspectos do tratamento e do mecanismo de ação destes fármacos.

1.7.1 Albendazol

O albendazol é um benzimidazol que foi originalmente desenvolvido como um fungicida de plantas e mais tarde como um anti-helmíntico de uso veterinário. O primeiro benzimidazol desenvolvido e licenciado para uso em humanos foi o tiabendazol em 1962. Desde então, quatro outros benzimidazoles (mebendazol, flubendazol, albendazol, triclabendazol) foram licenciados para uso em humanos em todo o mundo (Horton, 2000).

Os benzimidazoles são anti-helmínticos de amplo espectro que apresentam um mecanismo de ação principalmente contra nematóides gastrointestinais. Sabe-se que seu modo de ação envolve sua ligação a moléculas de β -tubulina do nematóide mais seletivamente do que à moléculas de β -tubulina do hospedeiro. Desta forma, a formação dos microtúbulos é inibida havendo uma perda de transporte de vesículas secretórias e incapacidade das células intestinais de captarem glicose (Martin *et al.*, 1997). O albendazol apresenta atividade tanto *in vitro* como *in vivo* em modelos animais e em humanos. Entretanto, pouco se sabe sobre o mecanismo de ação de albendazol, principalmente sobre filarídeos. A administração de 30 mg/ kg de mebendazol diariamente por três semanas em pacientes com *O. volvulus* demonstrou que este fármaco teve um efeito apenas fracamente microfilaricida. Contudo, foi observado um efeito bastante embriotóxico nas fêmeas adultas (Awadzi *et al.*, 1982).

Em muitas comunidades em desenvolvimento, a co-administração de albendazol com DEC ou ivermectina também proporciona uma série de benefícios para saúde pública, uma vez que albendazol age contra diversos helmintos intestinais (Ismail *et al.*, 1998; Beau de Rochars *et al.*, 2004). A razão para o uso desta combinação de fármacos é primeiramente o desejo de um regime dose única efetivo para o tratamento em massa, em segundo a morte de vermes adultos e microfilárias e finalmente prevenir a emergência de cepas resistentes (Mak, 2004).

1.7.2 Dietilcarbamazina (DEC)

Dietilcarbamazina (DEC), o fármaco mais utilizado no tratamento de infecções causadas por várias espécies de filarídeos, foi descoberta como tendo atividade filaricida

por Hewitt *et al.* (1947) usando como modelo experimental *Litomosoides sigmodontis* parasitando o roedor *Sigmodon hispidus* Say & Ord, 1825. Sua atividade contra microfilárias de *W. bancrofti* em pacientes humanos foi subseqüentemente demonstrada por Santiago-Stevenson *et al.* (1947). Apesar de estar sendo largamente utilizada no tratamento da filariose por mais de 60 anos, como um efetivo microfilaricida, o mecanismo de ação deste fármaco ainda não é completamente compreendido.

Estudos farmacológicos têm demonstrado que DEC interfere no metabolismo do ácido araquidônico, bloqueando assim a produção de eicosanóides como as prostaglandinas, que são potentes vasodilatadores e ativam inibidores de agregação de plaquetas e adesão endotelial (Davies *et al.*, 1984). Estas prostaglandinas, como PGE2 e PGI2, são produzidas por microfilárias, o que facilita sua passagem pela rede de capilares por aumentar o diâmetro destes. DEC bloqueia a produção de PGE2 e PGI2 tanto das microfilárias quanto das células endoteliais, causando assim a constrição dos capilares e impedindo a passagem da larva (Kanessa-Thanan *et al.*, 1991). Outros estudos têm demonstrado que DEC aumenta o nível de aderência da microfilária ao endotélio vascular, a plaquetas e granulócitos (Piessens & Beldekas, 1979; Maizels & Denham, 1992). Desta forma, juntamente com a vasoconstrição, a adesão celular do hospedeiro contribui para a atividade antifilarial de DEC.

Sabe-se que DEC exerce uma resposta imediata *in vivo*. Após quatro minutos de uma injeção intravenosa de DEC em pacientes portadores de filariose bancroftiana, a microfilaremia sanguínea diminuiu em 60% (Hawking & Laurie, 1949). Em *S. hispidus* foi observado um decréscimo de 80% nas microfilárias sanguíneas após um minuto da injeção de DEC (Hawking *et al.*, 1948).

No entanto, alguns autores demonstraram que DEC não apresenta nenhum efeito filaricida *in vitro* (Hawking *et al.*, 1948; Hawking & Laurie, 1949), a não ser quando utilizado em concentrações supratrapêuticas (Denham *et al.*, 1978). Num estudo *in vitro* verificou-se que DEC aumenta a aderência de granulócitos derivados do sangue de gato à superfície de microfilárias de *B. pahangi*. Os parasitos se tornaram imobilizados e em seguida degeneraram, sugerindo que DEC deve agir nos componentes do hospedeiro (Johnson *et al.* 1988). Deste modo, acredita-se que DEC apenas estimula a defesa do hospedeiro, aumentando a aderência microfilarial às células endoteliais e granulócitos, não apresentando um modo direto de ação (Maizels & Denham, 1992). Schardein *et al.* (1968) descreveram modificações ultraestruturais nas microfilárias de *L. carinii* após administração de DEC a gerbis *Meriones unguiculatus* (Milne-Edwards, 1867). Estes autores observaram microfilárias desembainhadas e, após 4 horas, foram observadas a lise e fagocitose destas larvas. No entanto, estes autores não excluem a possibilidade da destruição da microfilária ser causada pelo sistema imune, não sendo claro se DEC causa o desembainhamento diretamente ou indiretamente por fatores do soro.

Contudo, estudos recentes utilizando microscopia eletrônica de transmissão e de varredura têm demonstrado os efeitos de DEC *in vitro* na ultraestrutura de larvas de *W. bancrofti*, sugerindo que DEC apresenta um modo direto de ação (Florêncio & Peixoto, 2003; Peixoto *et al.*, 2003; Alves *et al.*, 2005). Após o tratamento de microfilárias de *W. bancrofti* com DEC *in vitro*, foram verificadas diversas alterações ultraestruturais como perda da bainha, formação de vacúolos, lise celular, desorganização celular com abundantes organelas eletrondensas e formação de corpos lamelares. Além disso, foi

observada a presença de leucócitos aderidos a superfície das microfilárias (Florêncio & Peixoto, 2003; Peixoto *et al.*, 2003).

Larvas infectantes (L₃) de *W. bancrofti* também foram analisadas ultraestruturalmente após tratamento *in vitro* com DEC. As larvas incubadas com 3 µg/ml de DEC não sofreram nenhuma alteração. Entretanto, após a incubação com 5 e 10 µg/ml de DEC foi observada uma desorganização celular com organelas eletrondensas degenerando e numerosos vacúolos contendo resíduos de organelas, além da presença de corpos lamelares na hipoderme. Em algumas microfilárias, houve completa destruição da célula muscular e danos nas células neuronais (Alves *et al.*, 2005).

Os efeitos de DEC sobre a ultraestrutura de microfilárias de *W. bancrofti* também foram estudados após tratamento *in vivo*. Passados 40 minutos do tratamento de um indivíduo microfilarêmico com 6 mg/kg de DEC, quase todas as microfilárias perderam suas bainhas e, em algumas delas, a permanência da bainha da microfilária na superfície da larva pode ser detectada. A cromatina condensada também foi observada nas células somáticas, e várias microfilárias apresentaram numerosos vacúolos. Após uma hora do tratamento de outro indivíduo com DEC, os danos foram mais severos, com completa lise de todas as organelas celulares e presença de uma membrana plasmática intacta envolvendo um espaço eletronuscente sugerindo um processo autolítico. Deste modo, acredita-se que DEC possa estimular um processo de apoptose (Peixoto *et al.*, 2004).

Peixoto (2005) verificou que algumas fêmeas de *W. bancrofti* obtidas de voluntários que receberam o tratamento recomendado de 12 dias com DEC, mostraram regiões do útero com poucos embriões, e outras fêmeas não mostraram nenhum

embrião, indicando um possível decréscimo da fertilidade no nematóide causado por este fármaco.

Em um experimento utilizando gerbis infectados com *B. pahangi*, verificou-se que 30 minutos após uma dose de 100 mg/kg de DEC injetada intraperitonealmente houve uma rápida redução da microfilaremia. Contudo, 3 a 4 horas depois, este valor começou a aumentar. Também foi observado que 30 minutos após o tratamento houve uma redução das microfilárias que estariam nos pulmões e um aumento destas na musculatura, sugerindo uma migração das microfilárias de um sítio para o outro. Como a concentração de DEC 30 minutos após o tratamento era muito menor na musculatura do que nos pulmões, acredita-se que as microfilárias estariam evitando o contato com estas altas concentrações e, além disso, sua localização extravascular previniria ataques por células efectoras do hospedeiro (Shigeno *et al.*, 2006).

O tratamento de um grupo de indivíduos infectados com *W. bancrofti* com 6 mg/kg de DEC a cada 6 meses, por 4 anos, demonstrou uma redução da intensidade dos antígenos filariais circulantes específicos para vermes adultos. Verificou-se então que a ação de DEC na viabilidade dos vermes adultos é lenta e gradual, e que a repetição do tratamento tem um profundo efeito na viabilidade destes helmintos (Simonsen *et al.*, 2005).

Apesar dos programas de administração de fármacos em massa apresentarem sucesso na redução da microfilaremia, os programas de eliminação dependem de escassas verbas da saúde pública (Babu *et al.*, 2004). Na China, o uso de sal fortificado com DEC contribuiu enormemente para a eliminação da transmissão da doença (Liu *et al.*, 1992). O estabelecimento de um programa que utilize o sal fortificado com DEC parece ser uma alternativa capaz de eliminar a filariose de forma econômica, além de

oferecer uma enorme possibilidade de reduzir a microfilaremia a limiares bastante baixos, diminuindo a transmissão (Lammie *et al.*, 2007).

Pouco se sabe sobre o real mecanismo de ação DEC, que tem um papel fundamental no controle e tratamento da filariose. Deste modo, estudos adicionais precisam ser realizados.

Esforços para interromper a transmissão e eliminar a filariose linfática como um problema de saúde público certamente dependem das campanhas efetivas de tratamento em massa e outras estratégias de saúde pública, incluindo controle de vetores quando apropriado. Contudo, a ausência de dados sobre o contexto sócio-cultural de cada comunidade tem se tornado um obstáculo fundamental para articular os programas de forma apropriada e com capacidade de resposta à realidade de cada comunidade. Acredita-se que não haja conhecimento suficiente dos fatores sócio-culturais associados à presença e ao tratamento da enfermidade. Métodos sociológicos devem ser utilizados para corrigir esta deficiência e assegurar a colaboração da comunidade na execução dos programas da filariose linfática, e a manutenção do êxito em diferentes localidades (Wynd *et al.*, 2007).

Devido às dificuldades de obter filarídeos humanos e questões éticas, modelos experimentais tais como *L. sigmodontis* Chandler 1931 e *L. chagasfilhoi* Moraes-Neto, Lanfredi & De Souza, 1997 têm sido mantidos em condições laboratoriais em diversos centros de estudo. O uso destes modelos permite uma melhor compreensão da biologia filarial, da relação parasito-hospedeiro, além de auxiliar no desenvolvimento de fármacos e permitir uma melhor compreensão do mecanismo de ação dos mesmos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

A proposta do presente estudo foi descrever ultraestruturalmente o sistema reprodutivo das fêmeas de *L. chagasfilhoi* por microscopia eletrônica de transmissão e verificar a presença da bactéria endossimbionte *Wolbachia* sp. Além disso, a observação da microfilaremia e das alterações ultraestruturais causadas pela administração *in vivo* de albendazol, DEC e da co-administração destas duas drogas foram estudadas a fim de elucidar o mecanismo de ação das mesmas.

2.1 Objetivos Específicos

- Caracterizar ultraestruturalmente fêmeas de *Litomosoides chagasfilhoi* provenientes de roedores (*Meriones unguiculatus*) não tratados, descrevendo principalmente o sistema reprodutor feminino;
- Verificar através de microscopia eletrônica de transmissão a presença da bactéria endossimbionte *Wolbachia* sp.;
- Analisar ultraestruturalmente as fêmeas de *L. chagasfilhoi* após o tratamento *in vivo* de *M. unguiculatus* com albendazol;
- Analisar ultraestruturalmente as fêmeas de *L. chagasfilhoi* após o tratamento *in*

vivo de *M. unguiculatus* com DEC;

- Analisar ultraestruturalmente as fêmeas de *L. chagasfilhoi* após o tratamento *in vivo* de *M. unguiculatus* com a co-administração de DEC com albendazol.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Infecção Experimental de Roedores da Espécie *Meriones unguiculatus*

Os roedores *Meriones unguiculatus* foram infectados experimentalmente utilizando como vetor ácaros da espécie *Ornithonyssus bacoti* contendo a larva infectante de 3º estágio, de acordo com Bertram *et al.* (1946). O ciclo de *Litomosoides chagasfilhoi* é mantido no infectório do Laboratório de Biologia de Helmintos Otto Wucherer desde 1995, com temperatura de 28-30°C e umidade de 80-85%.

3.2 Diagnóstico e Análise da Microfilaremia

O sangue dos roedores *M. unguiculatus* foi analisado 70 dias após a data de infecção, através do método de gota fresca para observação de microfilárias de *L. chagasfilhoi*.

3.3 Tratamento dos Roedores:

Os roedores foram tratados com uma dose única, via oral de dietilcarbamazina (DEC) (6 mg/kg ou 12 mg/ kg), albendazol (Zentel[®]) (40 mg ou 80 mg) ou com a co-administração de DEC + albendazol (Zentel[®]) (6 mg/kg de DEC + 40 mg de albendazol ou 12 mg/ kg de DEC + 80 mg de albendazol), 120 dias após a infecção. Eles foram tratados pela manhã, após período de 15 horas de jejum. Como controle foram utilizados os nematóides provenientes de roedores não tratados. Todos os roedores

apresentavam a mesma idade.

3.4 Obtenção de Vermes Adultos

Os roedores experimentalmente infectados, tratados ou não, foram necropsiados 14 dias após a administração das drogas, e os vermes adultos presentes na cavidade abdominal foram lavados em solução salina 0,9% e fixados em glutaraldeído 2,5 % + paraformaldeído 4% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2.

3.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão

O processamento do material para microscopia eletrônica de transmissão foi realizado de acordo com Haddad *et al.* (1998). Após a fixação as fêmeas de *L. chagasfilhoi* foram cortadas em pequenos pedaços com auxílio de um microscópio estereoscópico para permitir assim uma melhor penetração da resina durante o processo de inclusão. Para isto eles foram colocados em uma placa de Petri forrada com um pedaço de Parafilm[®] para amenizar a pressão durante o corte, que foi feito com uma lâmina cortante. Foram processadas amostras de diferentes regiões do corpo da fêmea.

Em seguida, o material foi lavado em tampão cacodilato 0,1 M pH 7,2 e pós-fixado em tetróxido de ósmio a 1%, ferricianeto de potássio 0,8% e cloreto de cálcio 5mM em solução cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2 por cerca de uma hora. Foram realizadas três lavagens de cinco minutos cada no mesmo tampão. A desidratação foi feita em uma série crescente de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100%, 30 minutos em cada, sendo as duas últimas vezes em acetona super seca). O material foi lentamente

infiltrado em uma série crescente de acetona-resina (Polybed[®]): (5:1), (4:1), (3:1), (2:1), (1:1), (1:2), (1:3), (1:4), (1:5) e resina pura três vezes (24 horas cada etapa) e polimerizado na mesma resina em estufa a 60° C por 48 horas. Os blocos foram trimados, e em seguida foram feitos cortes ultrafinos de aproximadamente 60 nm com auxílio do Ultramicrotomo Supernova ou RMC. Os cortes foram recolhidos em grades de cobre com 200 ou 300 malhas. A contrastação foi feita com acetato de uranila aquosa 5% e citrato de chumbo 1%. O material foi observado e micrografado no microscópio eletrônico de transmissão Zeiss 900, JEOL 1200 ou Zeiss 906.

4. RESULTADOS

No momento da necropsia, os nematóides provenientes dos diferentes roedores (tratados e não tratados) estavam vivos, e com uma motilidade aparentemente normal.

4.1 Ultraestrutura das fêmeas de *Litomosoides chagasfilhoi*

4.1.1 Parede do corpo

Através da microscopia eletrônica de transmissão foi possível observar que *Litomosoides chagasfilhoi* apresenta uma parede do corpo formada por cutícula, hipoderme e camada muscular (Figs 2,3). Em cortes longitudinais foi possível observar invaginações na cutícula, denominadas estriações cuticulares (Fig. 5). A cutícula é composta por diferentes camadas morfológicamente distintas. A camada mais externa é a epicutícula, que é trilaminar. Logo abaixo da epicutícula, temos a cutícula propriamente dita formada por quatro camadas: camada cortical, camada intermediária, camada fibrosa e camada basal. Entre a camada intermediária e a camada fibrosa há a presença de uma linha eletrondensa. A camada basal está intimamente associada à hipoderme, e a partir dela saem membranas convolutas bastante eletrondensas que estão mergulhadas na hipoderme ou no cordão hipodermal (Fig. 5).

A hipoderme é uma camada sincicial presente logo abaixo da cutícula onde há, além das membranas convolutas que a atravessam, perfis mitocondriais e retículo endoplasmático (Figs 4,5). Esta camada emite prolongamentos entre as fibras musculares na direção do pseudoceloma, formando os cordões hipodermis (Figs 6, 7). Perfis mitocondriais podem ser encontrados em diferentes regiões da hipoderme, mas se

encontram mais concentrados principalmente próximos à cutícula, próximo às membranas convolutas (Fig. 6). Abaixo destes perfis mitocondriais há uma grande quantidade de bactérias (Figs 6, 7). A região do cordão hipodermal mais próxima do pseudoceloma apresenta um aspecto esponjoso (Figs 6, 7), e possui finas fibrilas (Fig. 7). Todo o citoplasma hipodermal apresenta um aspecto granular.

Abaixo da fina camada de hipoderme há uma musculatura estriada, formada por fibras presentes entre cada cordão hipodermal que se dispõem longitudinalmente ao longo do corpo (Figs 2, 3). Cada fibra possui uma região contrátil e uma região não-contrátil. Em cortes transversais é possível observar que a porção contrátil é formada por miofilamentos organizados entre corpos densos. Na porção não contrátil, mais próxima do pseudoceloma, se encontram organelas celulares tais como retículo endoplasmático e perfis mitocondriais (Figs 2,3).

4.1.2 Sistema Reprodutor

O ovário de *L. chagasfilhoi* quando observado em secções transversais é circular e composto por um epitélio envolvido por uma lâmina basal, que consiste de uma única camada de células alongadas contendo citoplasma granular com retículo endoplasmático, complexo de Golgi, perfis mitocondriais e um núcleo com um denso nucléolo (Figs 8). O ovário não apresenta fibras musculares. Ele é composto por oócitos primários que estão arranjados radialmente. Cada oócito primário apresenta um citoplasma granular com perfis mitocondriais, retículo endoplasmático e núcleo com nucléolo (Figs 8-10). Estes oócitos primários não estão livres no gonotucto, mas estão centralmente conectados em torno de um eixo central, a raquis, por pontes

citoplasmáticas até que eles se tornem maduros (Fig. 11).

A parede uterina consiste de finas fibras musculares circulares e oblíquas envolvidas por uma lâmina basal e por um epitélio abaixo dessa lâmina. Na célula epitelial, imediatamente abaixo da lâmina basal, há um labirinto baso-lateral formado por invaginações da membrana. Neste epitélio, há várias organelas tais como perfis mitocondriais, complexo de Golgi, retículo endoplasmático e núcleo com nucléolo e, na membrana adjacente ao lúmen, apresenta invaginações com aspecto esponjoso (Figs 12-14). Algumas vezes a parede uterina está adjacente à parede do corpo, ao intestino ou, em outros cortes, foi possível observar duas paredes uterinas adjacentes sendo separadas pelo pseudoceloma (Figs 2, 12, 14).

A porção distal do útero apresenta diversos espermatozóides amebóides e aflagelados livres no lúmen ou adjacentes à superfície luminal do epitélio uterino (Figs 15, 16). Em cortes longitudinais, foi possível observar o formato amebóide do espermatozóide, que apresenta organelas concentradas em uma extremidade e um citoplasma granular livre de organelas na outra extremidade (Fig. 15). Cortes transversais da região com organelas do espermatozóide demonstraram a presença de um cromossomo eletrondenso, vários perfis mitocondriais arredondados e organelas membranosas. Estas organelas membranosas estavam raramente em contato com a membrana plasmática (Figs 18 e 19). Alguns espermatozóides estavam próximos aos oócitos, que apresentam em seu citoplasma retículo endoplasmático e algumas bactérias ovais ou arredondadas (Fig. 17).

Dentro da região distal do útero, foram observados zigotos. Estes zigotos são cobertos por uma casca de ovo eletrondensa bem definida e, abaixo desta casca há uma típica unidade de membrana ou oolema. O citoplasma é granular contendo retículo

endoplasmático, perfis mitocondriais e núcleo com nucléolo. Além disso, no citoplasma há a presença de bactérias que estavam organizadas em colônias em algumas regiões (Figs 20-23). Algumas destas bactérias estavam em divisão (Fig. 23).

Na região média do sistema reprodutor da fêmea as células embrionárias estavam em divisão envolvidas pela casca do ovo que em algumas regiões estavam em íntimo contato com a parede uterina (Fig. 24). No citoplasma dos embriões foram observados retículo endoplasmático, vacúolos e núcleo com nucléolo, e neste estágio de desenvolvimento, algumas bactérias foram observadas (Figs 24-27).

Os embriões crescem e se diferenciam ao longo do útero e na região distal do sistema reprodutor da fêmea, o desenvolvimento final das microfilárias foi observado. Estas microfilárias são envolvidas por uma bainha eletrondensa, não limitada por membranas (Figs 28-31). Elas apresentam uma fina cutícula com estriações transversais. Abaixo da cutícula há a presença de uma hipoderme inconspícua, formando cordões hipodermis onde o núcleo foi observado. A porção contrátil da célula muscular também foi observada. Além do núcleo hipodermal, a região pseudocelômica apresenta uma região nuclear proveniente das células somáticas (Fig. 32). Algumas microfilárias têm sua bainha em íntimo contato com o epitélio uterino. O epitélio apresenta, nesta região, uma grande quantidade de vesículas próximos à bainha, em contato com a microfilária (Fig. 33).

O estudo da fêmea de *L. chagasfilhoi* permitiu o conhecimento ultraestrutural desta espécie, servindo como controle para os experimentos subseqüentes utilizando tratamentos com albendazol, DEC e com a co-administração de DEC com albendazol.

4.1.3 Parede intestinal

A parede intestinal é composta por uma fina camada de células epiteliais de formato irregular envolvida por uma lâmina basal. Entre estas células há a presença de junções septadas, e no interior de cada célula intestinal há a presença de vacúolos e inclusões lipídicas (Figs 34, 35).

4.1.4 Bactérias Intracelulares de Nematoda

Análises ultraestruturais indicam a presença de endobactérias *Wolbachia-like* ovais ou arredondadas, medindo medindo de 0,35 a 0,85 μm . São envolvidas por dupla membrana e por um citoplasma contendo grânulos ribossomo-like (Figs 6, 7, 17). Estas bactérias foram observadas nos oócitos, zigotos, embriões, microfilárias e cordões hipodermis (Figs 20-23, 25, 27).

4.2 Tratamento com Albendazol

Os nematóides submetidos à ação de 40 mg de albendazol não demonstraram nenhuma alteração na parede do corpo, apresentando cutícula, hipoderme e camada muscular com aspectos normais (Figs 36, 37).

A parede uterina, que é formada por uma fina camada muscular envolvida por uma lâmina basal, e por um epitélio abaixo desta lâmina, apresentou, em algumas secções, uma maior quantidade de invaginações de membrana na região do labirinto baso-lateral presente logo abaixo da lâmina basal, havendo a formação de corpos de

mielina e de vesículas em algumas micrografias (Figs 38, 39). A região da parede uterina próxima ao lúmen, que está em contato com a bainha de embriões ou de microfilárias apresentou uma grande quantidade de vesículas (Figs 44, 53, 54, 55). Próximo a estas vesículas uma maior quantidade de complexo de Golgi foi observada (Figs 52, 53).

Na região média do útero de *L. chagasfilhoi* observou-se a presença de diversos embriões em desenvolvimento (Figs 40-43, 45). Cada embrião era envolvido por uma casca de ovo e apresentava em seu interior uma grande quantidade de núcleos. Apesar de muitos embriões apresentarem um aspecto normal, muitos se encontravam completamente desintegrados, tendo em seu interior a presença de vacúolos. Em alguns embriões nenhuma célula pôde ser diferenciada, havendo ausência de organelas. Os embriões apresentavam diferentes graus de eletrondensidade em seu interior, havendo algumas regiões mais eletrondensas e outra menos eletrondensas, com aspecto vazio (Figs 40-43). Alguns embriões, entretanto, estavam apenas iniciando seu processo de degeneração (Fig. 45).

Na região do útero próxima à vulva, havia a presença de diversas microfilárias em formação, envolvidas pela bainha (Figs 46-51). Embora algumas microfilárias apresentassem um aspecto íntegro, muitas estavam completamente degeneradas, não sendo possível diferenciar nenhuma organela (Figs 46-51). Em seu interior era possível apenas observar uma completa desorganização celular, havendo regiões bastante eletrondensas e regiões menos eletrondensas similar ao observado nos embriões. Mesmo as microfilárias degeneradas eram envolvidas por uma bainha de aspecto normal (Fig. 47). Algumas microfilárias estavam apenas iniciando seu processo de desintegração, havendo a presença de vacúolos em seu interior (Fig. 49).

O intestino destes nematóides permaneceu íntegro, sem nenhuma alteração, sendo composto por células epiteliais de formato irregular. No interior de cada célula intestinal havia a presença de vacúolos, e as junções septadas presentes entre cada célula foram observadas (Figs 56, 57).

Os nematóides submetidos a 80 mg de albendazol apresentaram uma parede do corpo sem nenhuma alteração, sendo formada por uma cutícula, hipoderme e camada muscular (Figs 58-60). A hipoderme apresentou-se íntegra, e as membranas convolutas foram observadas (Fig. 59). Na região não-contrátil da camada muscular foram observados diversos perfis mitocondriais (Fig. 60).

O cordão hipodermal não apresentou nenhuma alteração à ação do fármaco. No seu interior foram observadas diversas bactérias, similares ao controle (Figs 61, 62).

A parede uterina permaneceu inalterada (Figs 63, 64). No entanto, a região do epitélio uterino que está em contato com a bainha que envolve as microfilárias apresentou uma quantidade de vesículas reduzida (Figs 67, 69). Uma característica marcante dos nematóides submetidos a esta dose de albendazol foi que nenhuma microfilária íntegra foi observada após o tratamento. Todas as microfilárias estavam completamente destruídas (Figs 64-72). Seu interior era formado por um conteúdo eletrondenso apresentando diversos vacúolos (Figs 66, 68, 70-72). A bainha ainda estava presente, apesar de apresentar uma desorganização, não estando similar à observada no controle (Figs 67, 68). Em algumas regiões foi possível observar figuras de mielina sendo formadas (Fig. 68).

O intestino destes nematóides também não apresentou nenhuma alteração (Fig. 73).

4.3 Tratamento com Dietilcarbamazina (DEC)

Os nematóides submetidos ao tratamento com 6 mg/ kg de DEC não apresentaram nenhuma alteração na cutícula, hipoderme e camada muscular (Figs 74, 75).

A parede uterina apresentou um aspecto normal, estando similar ao controle (Figs 76, 79).

No lúmen da porção média do útero das fêmeas foi possível observar uma grande quantidade de embriões. Muitos destes embriões se encontravam íntegros, não apresentando nenhuma alteração gerada pelo fármaco. Entretanto, alguns embriões se encontravam completamente degenerados, apresentando diversos vacúolos em seu interior, e uma completa desorganização celular, não sendo possível diferenciar nenhuma organela (Figs 77, 78).

Em algumas regiões em que o útero estava em contato com embriões ou microfilárias, não foram observadas vesículas no epitélio uterino (Fig. 79), enquanto em outras regiões estas vesículas foram observadas (Fig. 76).

A porção mais próxima da vulva demonstrou a presença de diversas microfilárias em formação. Muitas delas apresentam um aspecto similar às do grupo controle, parecendo refratárias ao tratamento com 6 mg/ kg de DEC (Figs 80-87). Elas apresentam uma fina cutícula com estriações transversais, e é possível verificar a presença de cordões hipodermis com núcleos hipodermis, além de núcleos das células somáticas (Fig. 83). Em algumas microfilárias íntegras também foi possível verificar a presença de bactérias (Figs 83, 86). No entanto, algumas microfilárias se encontravam completamente degeneradas devido à ação do DEC, apresentando uma completa

desorganização celular (Figs 79-85, 87). Em seu interior havia a presença de vacúolos e regiões mais eletrondensas e outras menos eletrondensas, apresentando um aspecto vazio (Figs 84, 85, 87). Nestas microfilárias nenhuma organela pôde ser diferenciada. A casca do ovo e a bainha não apresentaram nenhuma alteração (Figs 78-80).

Os nematóides que sofreram ação de 12 mg/kg de DEC apresentaram uma parede do corpo sem alterações, apresentando uma cutícula, hipoderme e camada muscular de aspecto normal (Fig. 88). O cordão hipodermal também apresentou um aspecto similar ao do controle (Fig. 89). Em cortes longitudinais, as estriações cuticulares estavam bem nítidas (Figs 88, 89).

Alguns embriões presentes na porção média do útero não apresentaram nenhuma alteração, sendo possível observar uma série de núcleos no interior de suas células, e uma casca do ovo bem definida (Figs 90, 91, 98). Contudo, a maioria dos embriões presentes nesta região estava completamente alterada. Foi observada uma grande quantidade de figuras de mielina, de vacúolos e de retículo endoplasmático nas diferentes células embrionárias, que estavam iniciando um processo degenerativo (Figs 92-97). Em muitos embriões os núcleos já não eram evidentes, diferentemente do observado no controle.

A parede do útero não apresentou nenhuma alteração, possuindo perfis mitocondriais e complexo de Golgi (Figs 103, 104). Uma grande quantidade de vesículas foi encontrada tanto em áreas adjacentes a embriões e microfilárias íntegros quanto em áreas adjacentes a embriões e microfilárias em degeneração (Figs 99, 100-102, 106).

Na região do útero próxima à vulva foi observada a presença de diversas microfilárias em formação. Embora algumas microfilárias não tenham sofrido ação do

fármaco (Fig. 98), muitas se encontraram completamente degeneradas (Figs 100-102, 105). Algumas destas microfilárias degeneradas não apresentavam bainha (Figs 100, 105).

4.4 Tratamento com a co-administração de DEC + Albendazol

Os nematóides submetidos à ação de 6 mg/kg de DEC co-administrados com 40 mg de albendazol apresentaram uma cutícula de aspecto similar ao controle, não demonstrando nenhuma alteração (Fig. 107). No entanto, em algumas regiões da hipoderme foram observados vacúolos (Figs 107, 108). A região contrátil da camada muscular não apresentou nenhuma alteração, mas na região não-contrátil foram observados diversos vacúolos demonstrando o início de um processo degenerativo (Figs 107-110).

No cordão hipodermal, além de perfis mitocondriais e de bactérias, foram observadas estruturas bastante eletrondensas similares a figuras de mielina (Figs 111, 112). Tais estruturas não foram observadas no grupo controle e indicam uma alteração.

Embora alguns zigotos e espermatozoides não tenham sofrido nenhuma alteração (Fig. 113), muitos zigotos apresentaram figuras de mielina em seu interior, sugerindo uma consequência da ação dos fármacos. Uma grande quantidade de retículo endoplasmático também foi observada nestes zigotos (Figs 114, 115).

Na porção média do útero foram observados embriões no início de seu desenvolvimento completamente alterados. Suas células apresentaram corpos de mielina e diversos vacúolos, indicando um processo degenerativo. Muitas células destes embriões já não apresentavam mais nenhuma organela visível (Figs 116, 117, 119 e

120-125). Bactérias também foram observadas nestes embriões (Fig. 118).

No interior da porção distal do útero foram observadas diversas microfilárias em formação, sendo que a maioria estava completamente degenerada. Nenhuma célula pôde ser diferenciada, e o citoplasma apresentava um conteúdo eletrondenso possuindo vacúolos (Figs 130, 133-136). Mesmo as microfilárias aparentemente menos degeneradas já apresentavam uma desorganização celular e o início de um processo de desintegração, contendo núcleos rompidos e regiões bastante eletrondensas (Figs 128, 131, 132).

A parede do útero apresentou na região não-contrátil da camada muscular alguns vacúolos (Fig. 127). O epitélio uterino apresentou uma quantidade de invaginações na região do labirinto baso-lateral bastante exacerbada, diferente do observado no controle. Algumas áreas destas invaginações demonstraram ser muito eletrondensas, indicando um processo degenerativo em regiões da parede uterina (Figs 126, 127, 129, 130). Além disso, uma grande quantidade de complexo de Golgi foi observada (Fig. 131). Na região do epitélio uterino que faz contato com os embriões uma intensa quantidade de vesículas foi observada, mesmo quando estes embriões já haviam degenerado (Figs 131-136).

Os nematóides submetidos à ação de 12 mg/ kg de DEC co-administrados com 80 mg de albendazol apresentaram uma cutícula íntegra, sem nenhuma alteração (Figs 137, 139). A hipoderme apresentou, em algumas regiões, vacúolos (Fig. 137). A região contrátil da camada muscular não apresentou nenhuma alteração sendo composto por miofibrilas íntegras, organizadas entre os corpos densos (Figs 137, 138, 140). Contudo, na região não-contrátil foram observados vacúolos em algumas micrografias (Fig. 140). Nos cordões hipodermis foi observado um grande vacúolo no meio do núcleo, havendo

uma concentração de perfis mitocondriais ao redor desta região (Figs 141, 142). Também foram observadas pequenas figuras de mielina no cordão hipodermal (Fig. 143). As bactérias presentes nesta região não apresentavam nenhuma alteração (Fig. 143).

Os zigotos presentes na região mais proximal do útero apresentavam uma desorganização celular, possuindo vacúolos e figuras de mielina (Figs 145-150).

Os embriões possuíam um aspecto desintegrado, não sendo possível diferenciar nenhuma organela celular. Em seu interior havia vacúolos, figuras de mielina e algumas regiões com aspecto vazio. A casca do ovo apresentou uma morfologia alterada, possuindo um aspecto enrugado (Figs 151-154).

Microfilárias em desenvolvimento também foram observadas no interior do útero. Contudo, grande parte delas se encontrava completamente desintegrada (Figs 157-162). Em algumas microfilárias, núcleos e diversos vacúolos foram observados (Figs 159-162), enquanto outras apresentavam um citoplasma eletrondenso com completa desorganização celular (Figs 157, 158).

A parede uterina apresentou em algumas regiões um labirinto baso-lateral aumentado, havendo uma maior concentração de invaginações de membrana (Figs 155, 156). Um corpo multivesicular bastante eletrondenso também foi observado na região do epitélio uterino, próximo ao lúmen (Fig. 144). Em algumas micrografias foram observadas diversas vesículas na região em que o epitélio uterino faz contato com o embrião ou com as microfilárias, enquanto em outras micrografias estas vesículas não foram observadas (Figs 144, 157).

O intestino destes nematóides não apresentou nenhuma alteração, sendo possível observar células irregulares apresentando vacúolos e inclusões lipídicas (Figs 163, 164).

4.5 Comparação dos efeitos dos fármacos

A administração de albendazol, dietilcarbamazina e da co-administração de DEC + albendazol causaram nas fêmeas de *L. chagasfilhoi* um processo degenerativo principalmente nos embriões e nas microfilárias intra-uterinas, havendo a formação de vacúolos levando à morte celular. Em alguns casos houve ainda perda da bainha das microfilárias. As diferentes alterações variaram dependendo do tipo de tratamento.

As alterações ultraestruturais produzidas pelo tratamento com 40 mg de albendazol incluíram um maior número de invaginações de membrana no labirinto baso-lateral do epitélio uterino e a presença de figuras de mielina nesta região. Além disso, muitos embriões e microfilárias presentes no interior do útero se encontravam num estado degenerativo. O tratamento com 80 mg de albendazol aumentou o processo de degeneração celular onde todas as microfilárias observadas no interior do útero estavam completamente danificadas.

Os nematóides submetidos à ação de DEC demonstraram muitos embriões e microfilárias destruídos no interior do útero e, após a administração de 12 mg/kg a bainha de algumas microfilárias foi danificada.

A ação de 6 mg/kg de DEC co-administrados com 40 mg de albendazol ou 12 mg/kg de DEC co-administrados com 80 mg de albendazol sobre as fêmeas de *L. chagasfilhoi* demonstrou uma atuação sobre zigotos, embriões e microfilárias, que estavam completamente degenerados, além de alterações na hipoderme, no cordão hipodermal e na região não-contrátil da camada muscular.

Os resultados demonstraram que a administração do albendazol 80 mg é efetiva na degeneração de microfilárias e quando co-administrada ao DEC apresenta efeitos

adicionais na parede do corpo.

O presente estudo contribui para o conhecimento dos efeitos de DEC, albendazol e da co-administração destes dois fármacos nos filarídeos, e enfatiza o potencial embriotóxico e microfilaricida destes dois fármacos.

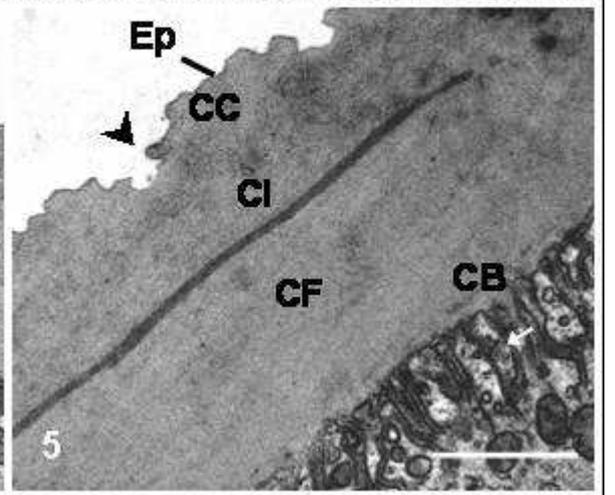
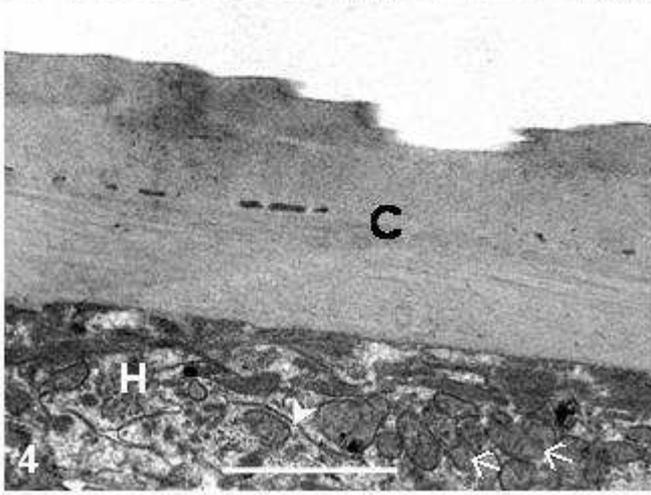
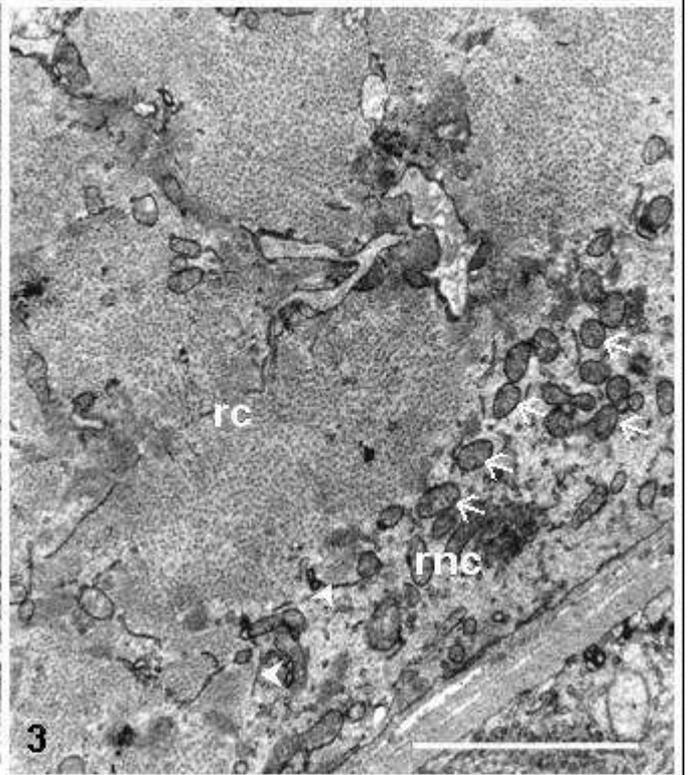
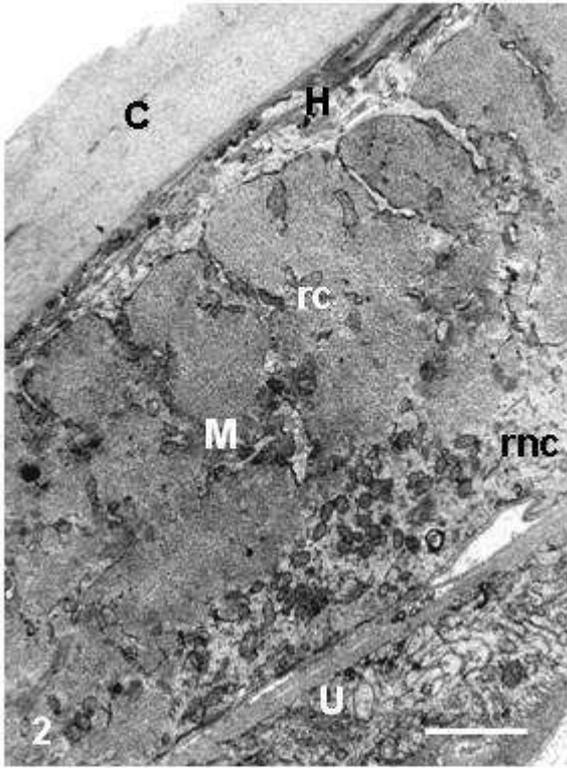
Figs 2-5: Microscopia eletrônica de transmissão das fêmeas de *Litomosoides chagasfilhoi* (controle).

Fig. 2. Corte oblíquo da parede do corpo formada por cutícula (C), hipoderme (H) e camada muscular (M). Cada fibra muscular possui uma região contrátil (rc) e uma região não-contrátil (rnc). O útero (U) se encontra adjacente a parede do corpo. Barra 2 μm .

Fig. 3. Detalhe da fibra muscular, formada por uma região contrátil rica em miofilamentos (rc), e uma região não-contrátil (rnc), onde se encontram organelas celulares como retículo endoplasmático (cabeça de seta) e perfis mitocondriais (seta fina). Barra 2 μm .

Fig. 4. Corte oblíquo da cutícula de *L. chagasfilhoi* (C) sendo possível observar a hipoderme sincicial logo abaixo desta (H), apresentando organelas celulares como perfis mitocondriais (seta fina) e retículo endoplasmático (cabeça de seta). Barra 1 μm .

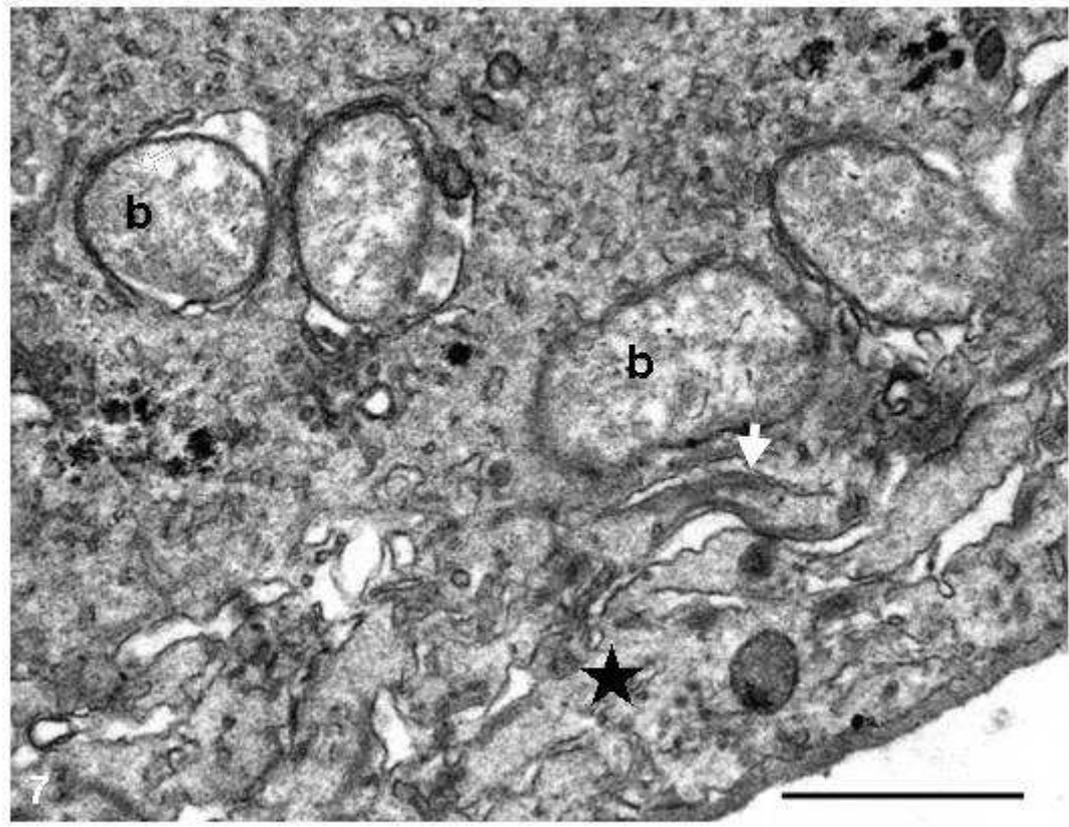
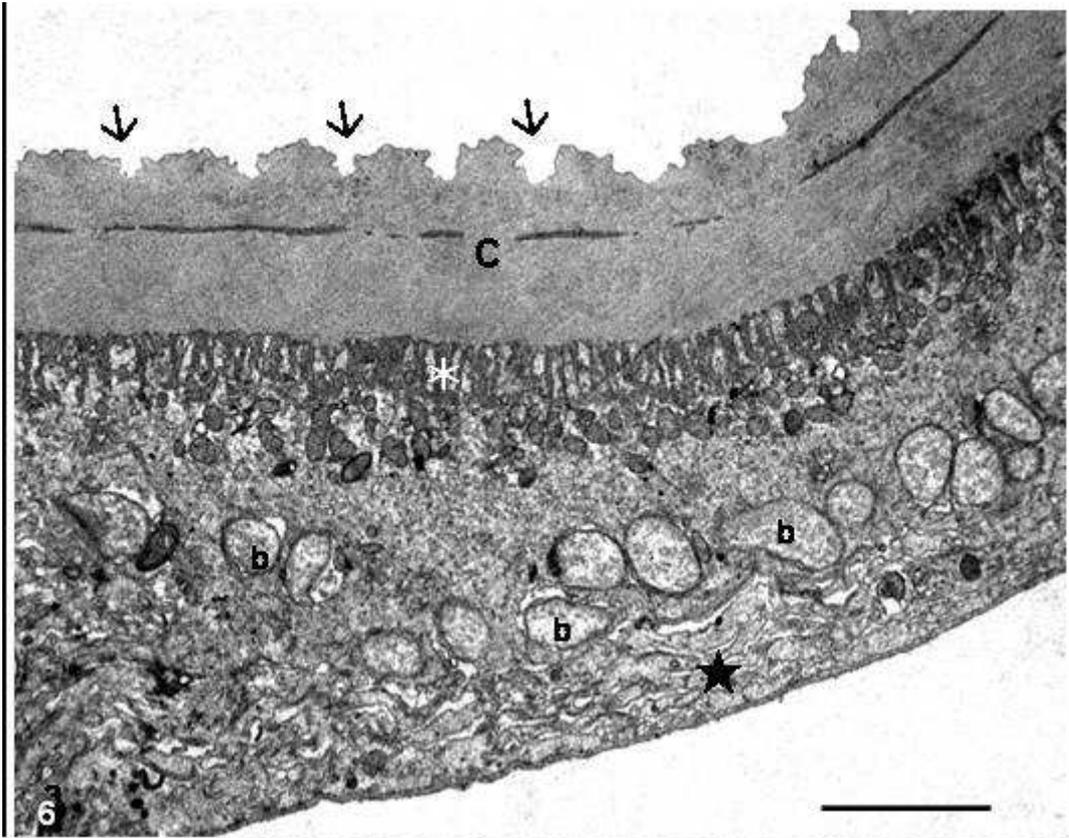
Fig. 5. Corte longitudinal da cutícula de *L. chagasfilhoi* sendo possível observar as diferentes camadas: epicutícula (Ep), camada cortical (CC), camada intermediária (CI), camada fibrosa (CF) e camada basal (CB). A partir da camada basal saem membranas convolutas bastante eletrondensas (seta fina) que estão mergulhadas no cordão hipodermal. É possível observar as estriações cuticulares (cabeça de seta). Barra 1 μm .



Figs. 6-7: Cortes longitudinais do cordão hipodermal das fêmeas de *Litomosoides chagasfilhoi* (controle) por microscopia eletrônica de transmissão.

Fig. 6. Cordão hipodermal apresentando uma cutícula onde as estriações cuticulares foram visíveis (seta fina). Abaixo da cutícula há uma região onde estão presentes as membranas convolutas (asterisco) e uma série de perfis mitocondriais. Abaixo desta região, há uma grande quantidade de bactérias (b). A região do cordão hipodermal mais próxima do pseudoceloma apresenta um aspecto esponjoso (estrela). Barra 5 μm .

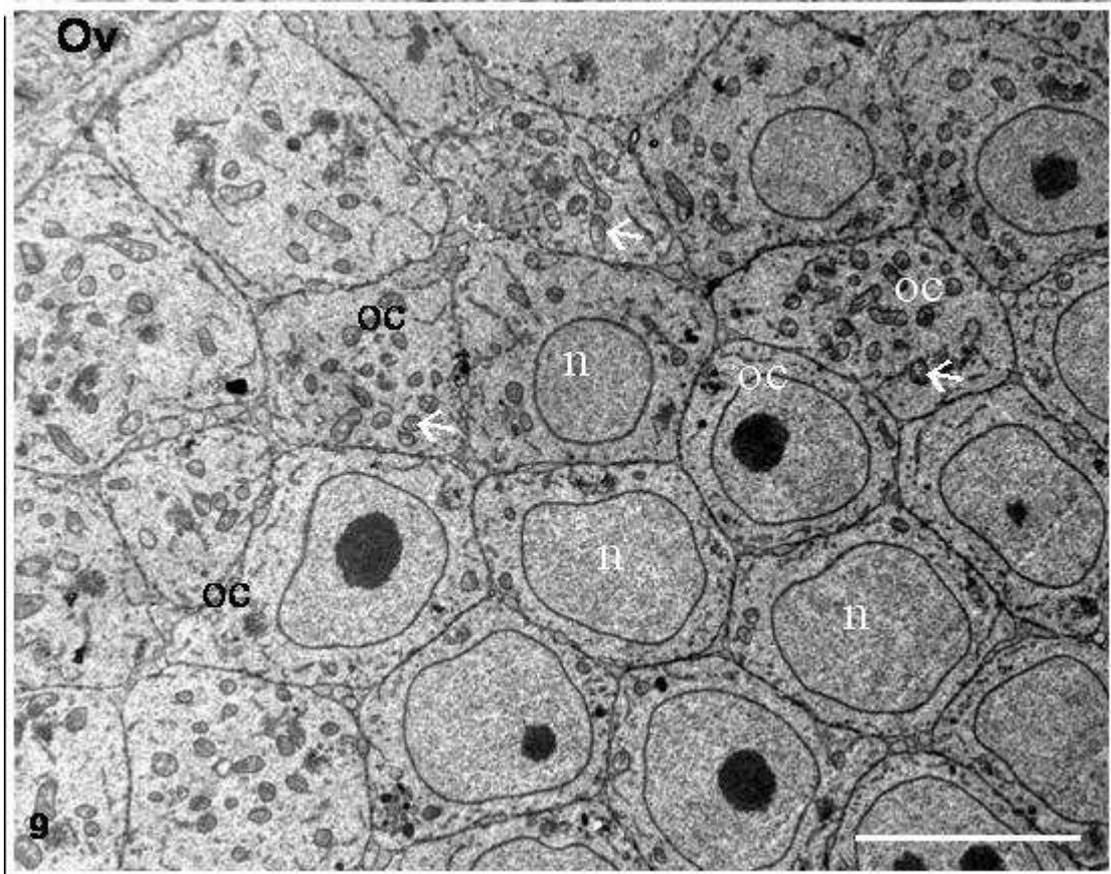
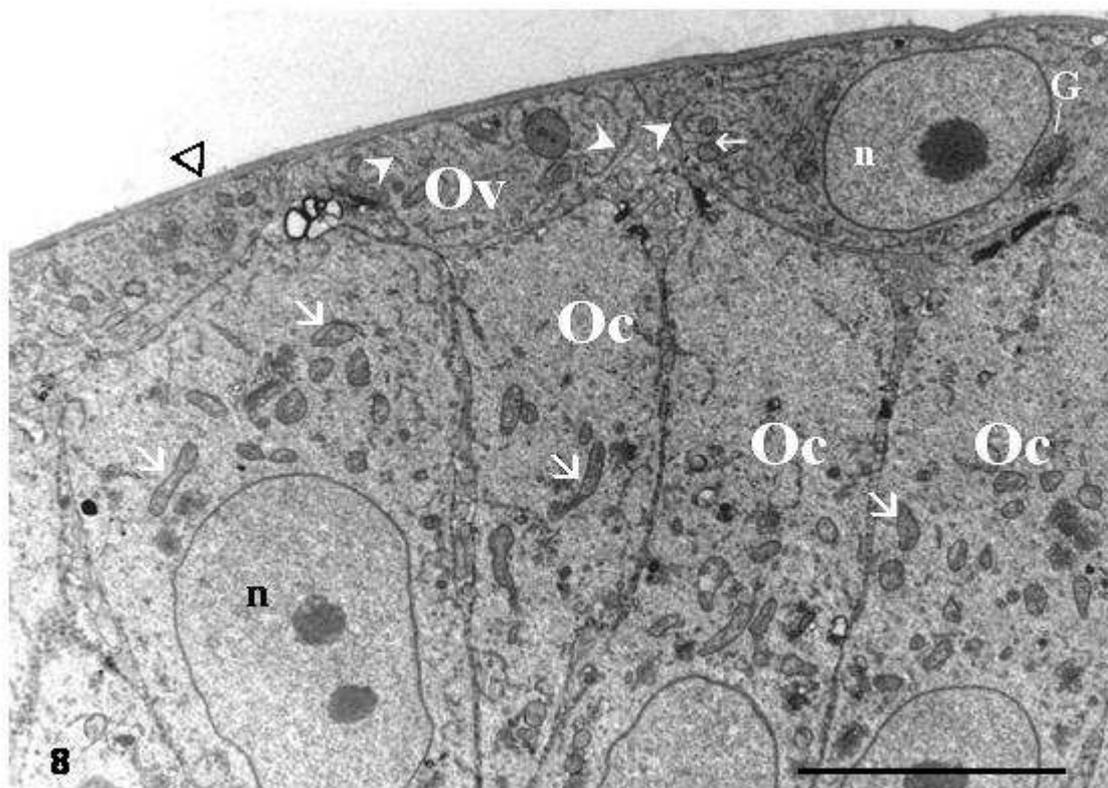
Fig. 7. Detalhe do cordão hipodermal apresentando bactérias (b). A região mais próxima do pseudoceloma apresenta um aspecto esponjoso (estrela). Nesta região há a presença de finas fibrilas (seta). O citoplasma hipodermal possui um aspecto granular. Barra 1 μm .



Figs 8-9: Microscopia eletrônica de transmissão do ovário de *L. chagasfilhoi* (controle).

Fig. 8. Corte longitudinal do ovário, sendo possível visualizar o epitélio (Ov) envolvido por uma lâmina basal (cabeça de seta vazada), que consiste de uma única camada de células alongadas contendo citoplasma granular com retículo endoplasmático (cabeça de seta cheia), complexo de Golgi (G), perfis mitocondriais (seta fina) e núcleo com um denso nucléolo (n). O ovário é composto por oócitos primários (Oc) que estão arranjados radialmente. Cada oócito apresenta perfis mitocondriais (seta fina) e núcleo (n) com nucléolo. Barra 5 μm .

Fig. 9. Corte transversal do ovário sendo possível visualizar o epitélio (Ov) . No interior deste há uma série de oócitos primários (Oc) que estão arranjados radialmente. Cada oócito apresenta perfis mitocondriais (seta fina) e núcleo (n) com nucléolo. Barra 5 μm .



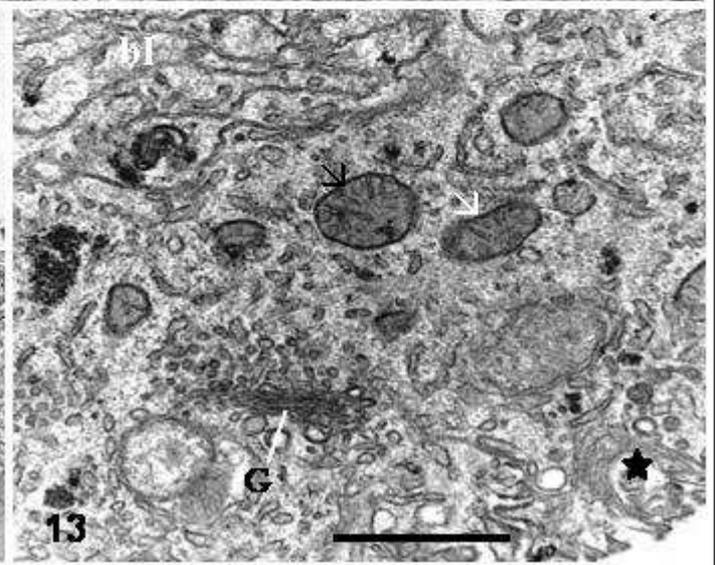
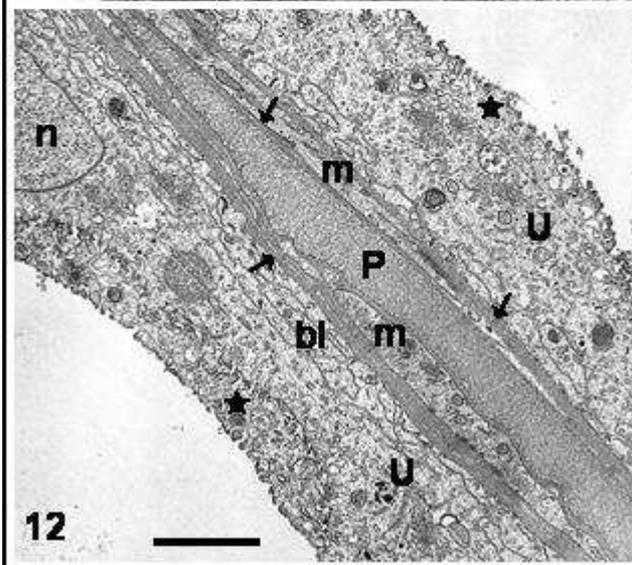
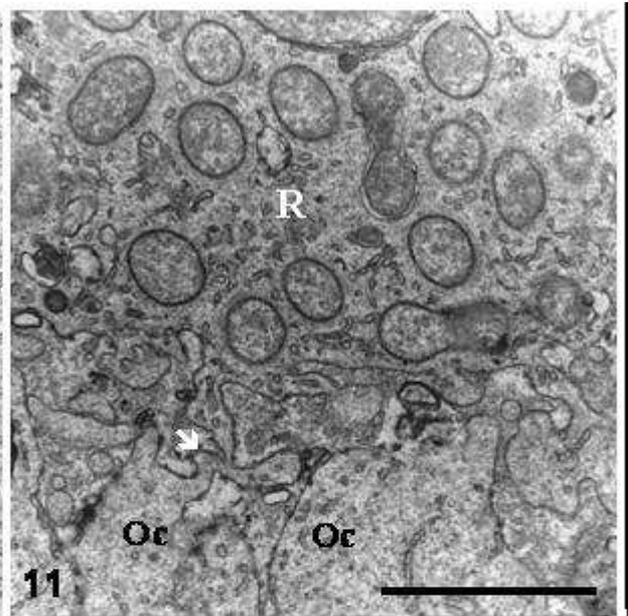
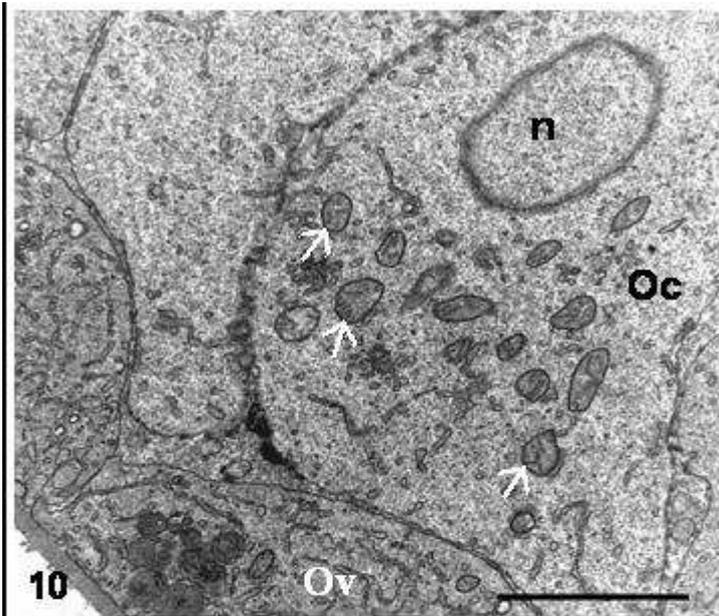
Figs 10-13: Microscopia eletrônica de transmissão das fêmeas de *Litomosoides chagasfilhoi* (controle).

Fig. 10. Detalhe do epitélio ovariano (Ov) apresentando oócitos primários em seu interior (Oc) contendo núcleo (n) e diversos perfis mitocondriais (seta fina). Barra 2 μm .

Fig. 11. Detalhe da raquis (R), em torno da qual os oócitos primários estão centralmente arranjados e conectados por pontes citoplasmáticas (seta). Barra 2 μm .

Fig. 12. Presença de duas paredes uterinas adjacentes (U), separadas pelo pseudoceloma (P). Cada parede uterina apresenta finas fibras musculares circulares e oblíquas (m) envolvidas por uma lâmina basal (seta). Adjacente à lâmina o epitélio apresenta um labirinto baso-lateral (bl) além de várias organelas celulares e, na membrana adjacente ao lúmen, invaginações com aspecto esponjoso (estrela). n, núcleo. Barra 2 μm

Fig. 13. Detalhe do epitélio uterino sendo possível observar o labirinto baso-lateral, e organelas como complexo de Golgi (G) e perfis mitocondriais (seta). A membrana adjacente ao lúmen, apresenta invaginações com aspecto esponjoso (estrela). Barra 1 μm



Figs 14-19: Microscopia eletrônica de transmissão das fêmeas de *Litomosoides chagasfilhoi* (controle).

Fig. 14. Parede do útero (U) adjacente ao intestino (I), sendo separados pelo pseudoceloma (P). No útero (U) é possível observar as finas fibras musculares circulares e oblíquas (m) envolvidas por uma lâmina basal (seta) e o epitélio com a região do labirinto baso-lateral (bl). G, complexo de Golgi; n, núcleo. Barra 2 μm .

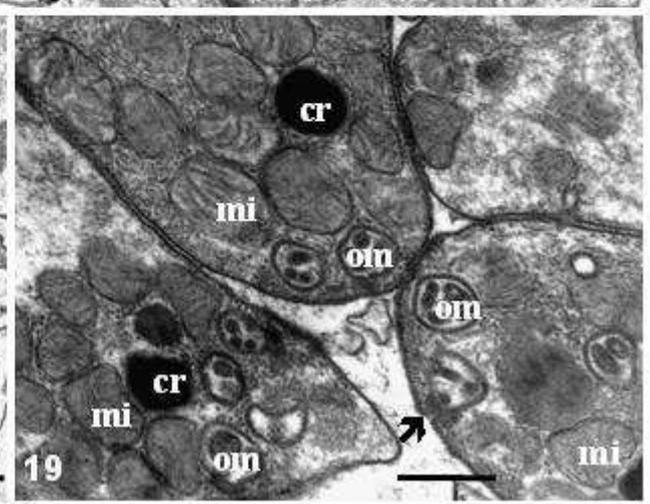
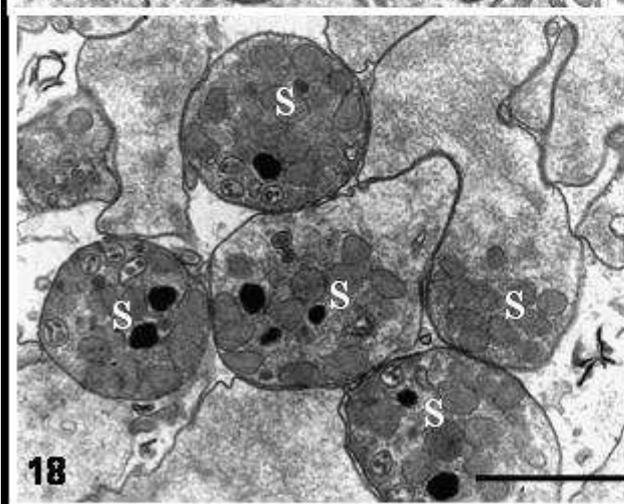
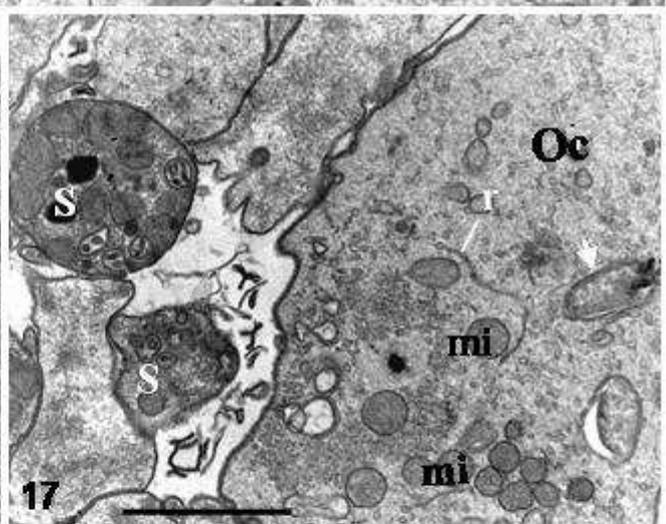
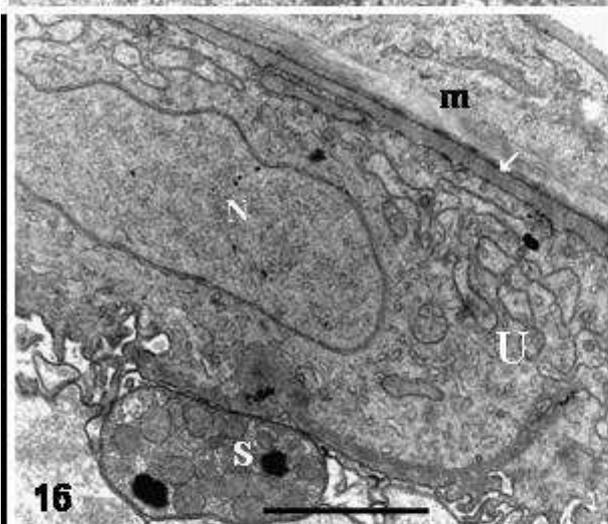
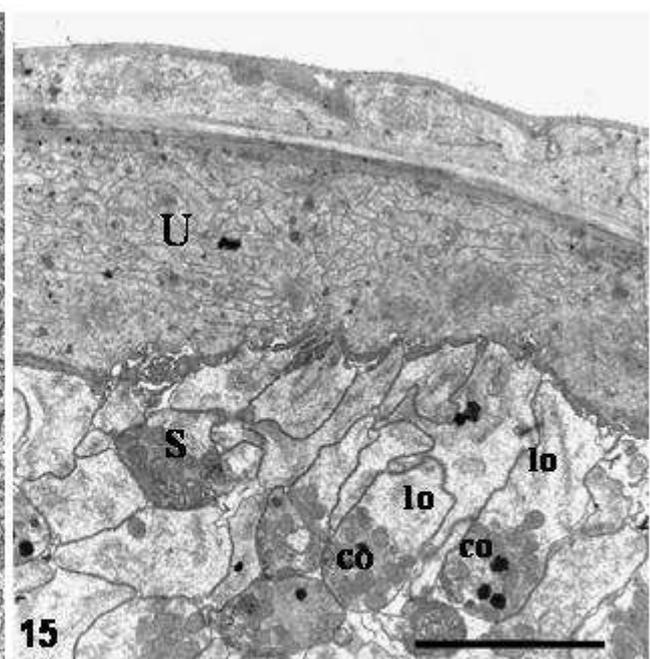
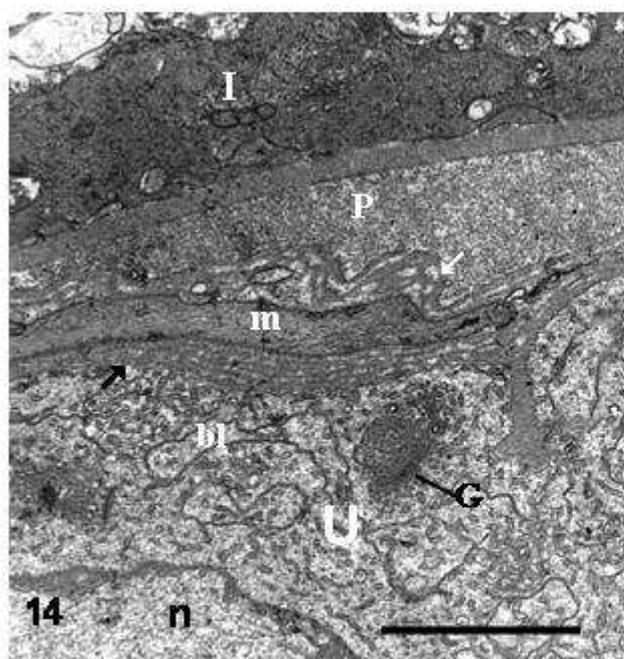
Fig. 15. Porção distal do útero apresentando diversos espermatozoides amebóides e aflagelados (S) livres no lúmen do útero. Cada espermatozoide apresenta organelas concentradas em uma extremidade (co) e um citoplasma granular livre de organelas na outra extremidade (lo). Barra 5 μm .

Fig. 16. Presença de espermatozoide (S) adjacente ao útero (U). É possível observar a fina camada muscular que envolve a parede uterina (m) e a presença de um núcleo (n) no epitélio uterino. Barra 2 μm .

Fig. 17. Presença de espermatozoides (S) próximos à oócitos (Oc), que apresentam em seu citoplasma retículo endoplasmático (r), algumas bactérias (seta) e perfis mitocondriais (mi). Barra 2 μm .

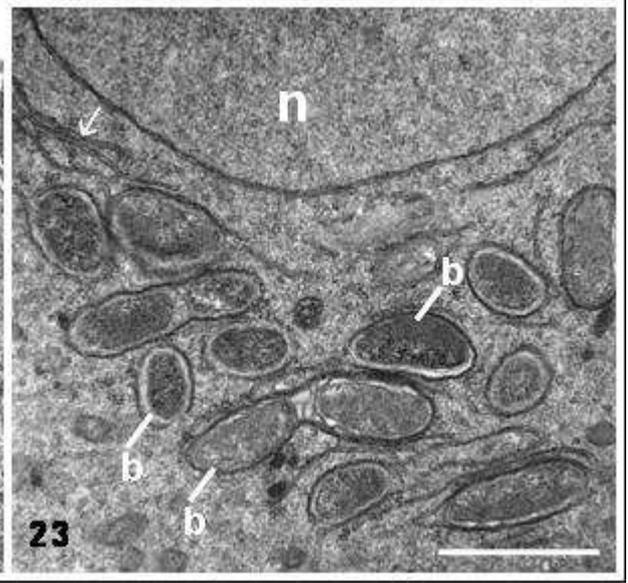
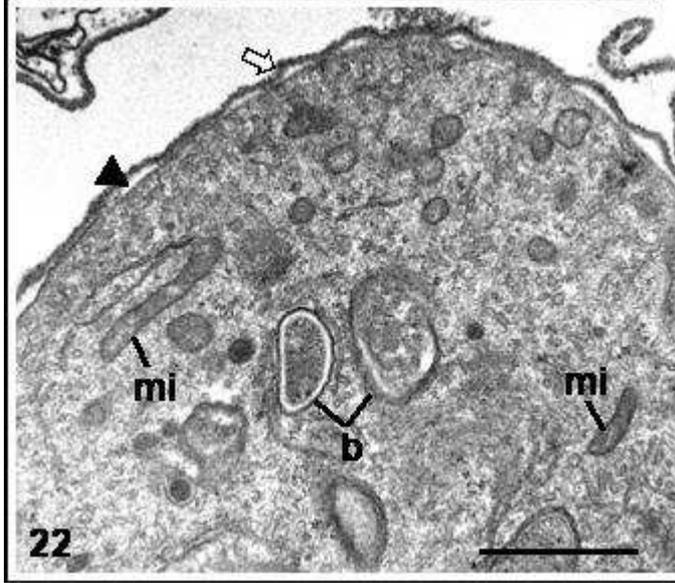
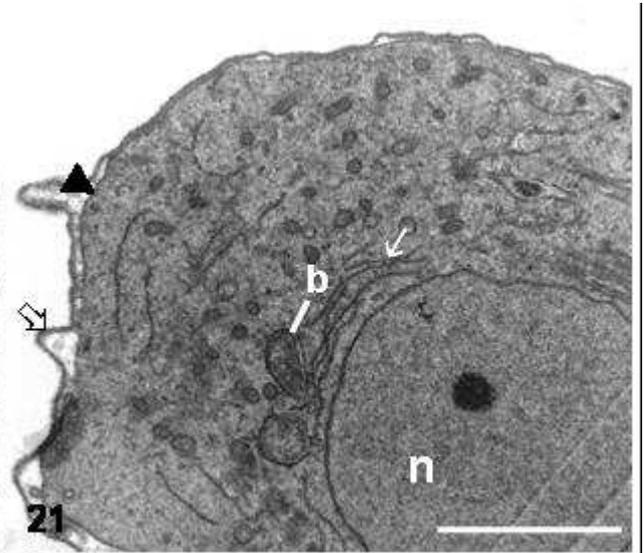
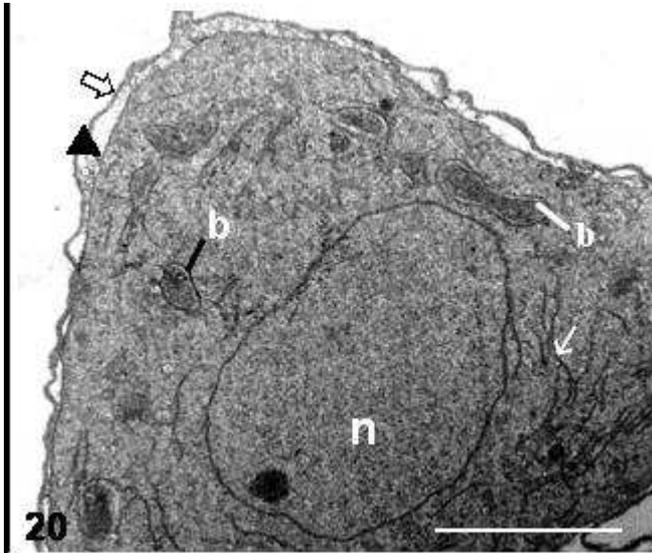
Fig. 18. Presença de diversos espermatozoides (S) na porção distal do útero. Barra 2 μm .

Fig. 19. Cortes transversais de espermatozoides demonstrando a presença de um cromossomo eletrondenso (cr), vários perfis mitocondriais de aspecto arredondado (mi) e organelas membranosas (om). Estas organelas membranosas estavam raramente em contato com a membrana plasmática (seta). Barra 0,5 μm .



Figs 20-23. Microscopia eletrônica de transmissão das fêmeas de *Litomosoides chagasfilhoi* (controle).

Figs 20-23. Zigotos presentes no interior do útero. Cada zigoto é coberto por uma casca de ovo eletrondensa bem definida (seta larga vazada) e, abaixo desta casca há uma típica unidade de membrana ou oolema (cabeça de seta). No citoplasma há a presença de retículo endoplasmático (seta fina), perfis mitocondriais (mi), núcleo com nucléolo (n), além da presença de bactérias (b). Barras: 2 μm , 2 μm , 1 μm e 1 μm , respectivamente.



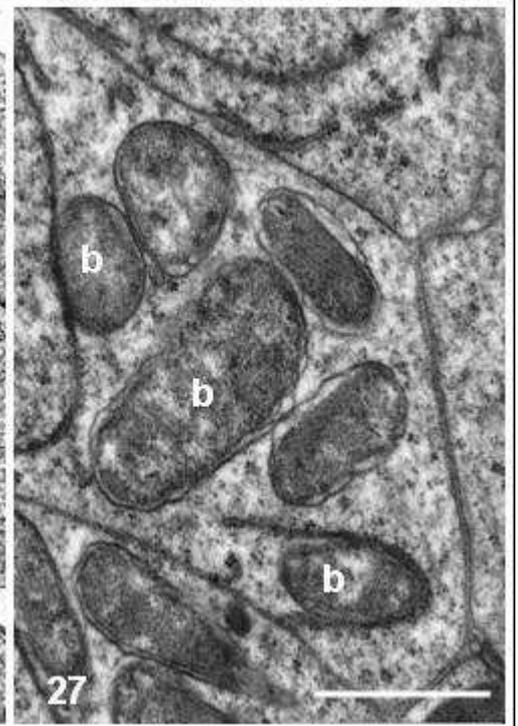
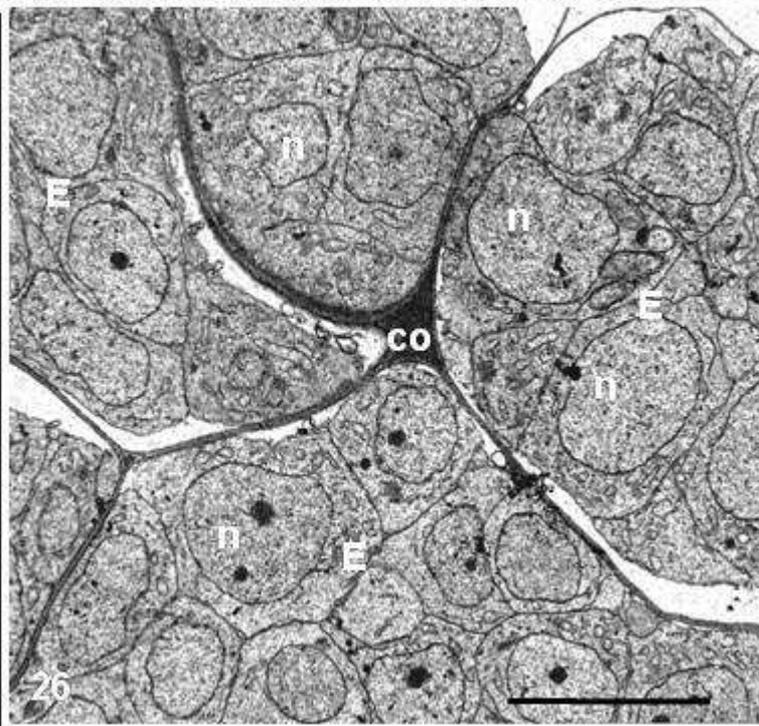
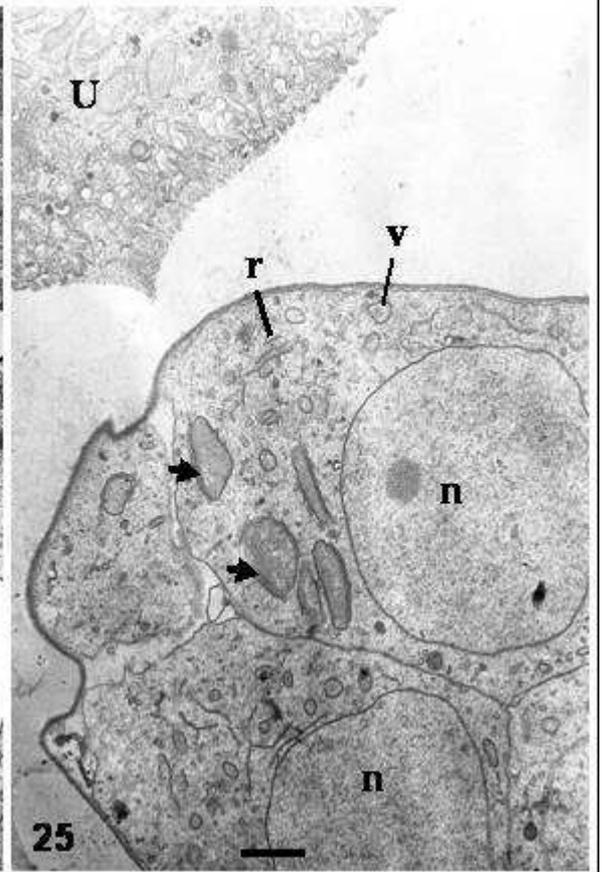
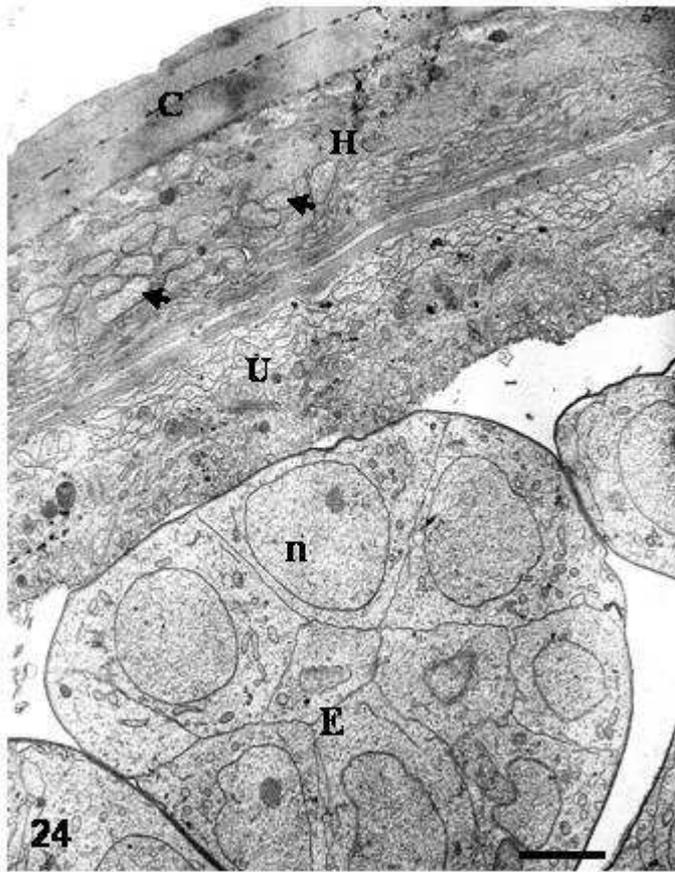
Figs 24-27. Microscopia eletrônica de transmissão das fêmeas de *Litomosoides chagasfilhoi* (controle).

Fig. 24. Região média do sistema reprodutor da fêmea sendo possível observar a parede do corpo na altura do cordão hipodermal (H), a parede do útero adjacente (U), e embriões em desenvolvimento em seu interior (E). No cordão hipodermal diversas bactérias são observadas (setas). C, cutícula; n, núcleo. Barra 2 μm .

Fig. 25. Embrião (E) presente no interior do útero (U) apresentando núcleo (n), bactérias (setas), vacúolos (v) e retículo endoplasmático (r) em seu interior. Barra 1 μm .

Fig. 26. Diversos embriões em desenvolvimento (E) envoltos por uma casca do ovo (co) bastante eletrondensa. n, núcleo. Barra 5 μm .

Fig. 27. Detalhe de bactérias (b) presentes no citoplasma dos embriões. Barra 1 μm .

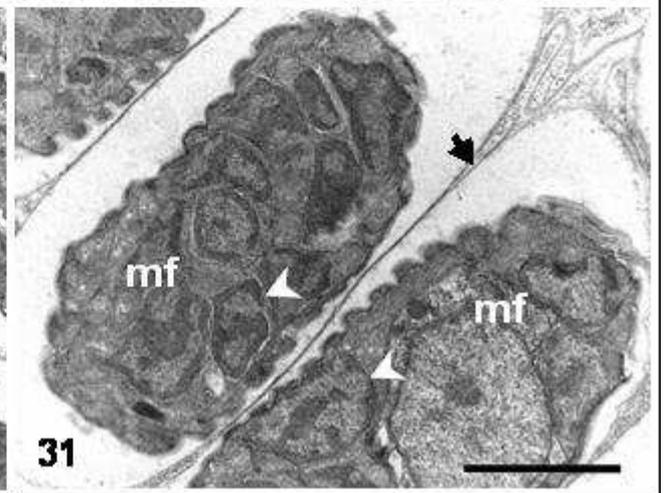
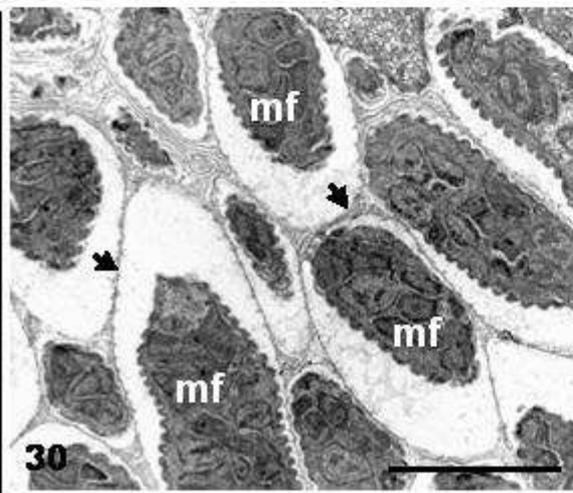
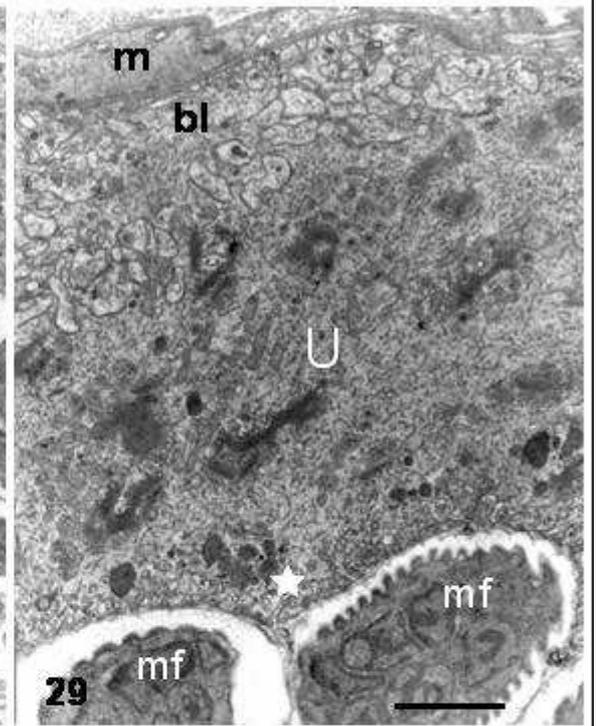
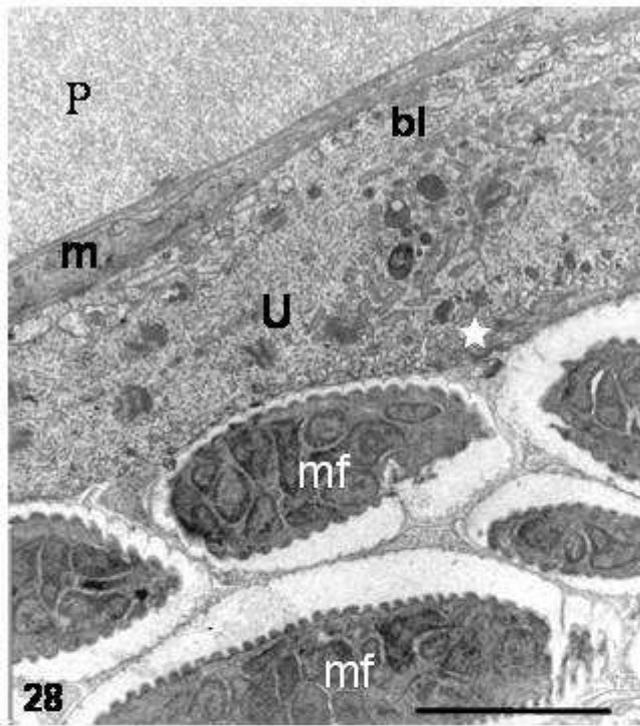


Figs 28-31. Microscopia eletrônica de transmissão das microfilárias presentes na porção proximal do útero da fêmea de *Litomosoides chagasfilhoi* (controle).

Figs 28 e 29. Parede do útero (U) apresentando uma fina região muscular (m) e um epitélio uterino contendo um labirinto baso-lateral (bl) logo abaixo da região muscular e uma região esponjosa próxima ao lúmen (estrela). No interior do útero, há a presença de diversas microfilárias (mf). P, pseudoceloma. Barras 5 μm e 2 μm , respectivamente.

Fig. 30. Microfilárias (Mf) presentes no interior do útero sendo recobertas por uma bainha (seta). Barra 2 μm .

Fig. 31. Corte longitudinal de microfilárias no interior do útero apresentando núcleos hipodermis e núcleos provenientes de células somáticas (cabeça de seta). Envolvendo cada microfilária há a presença de uma bainha (seta). Barra 2 μm .

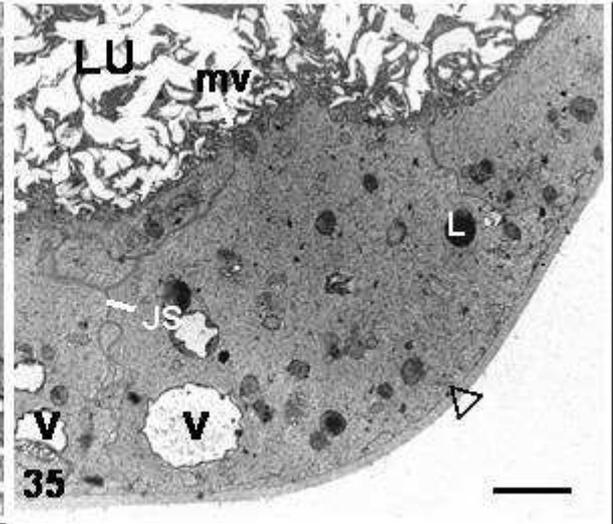
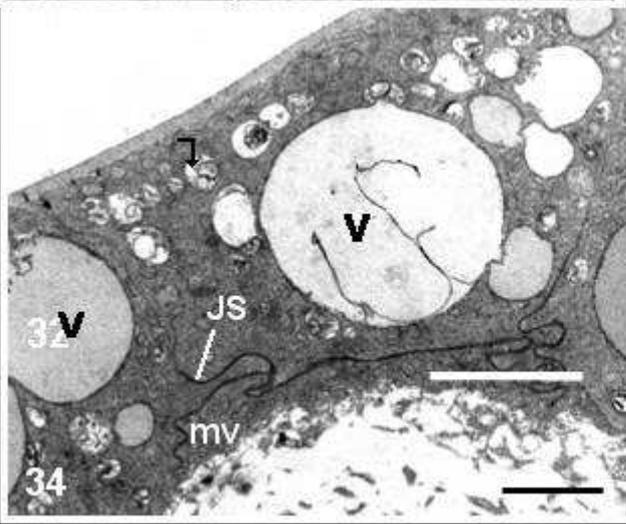
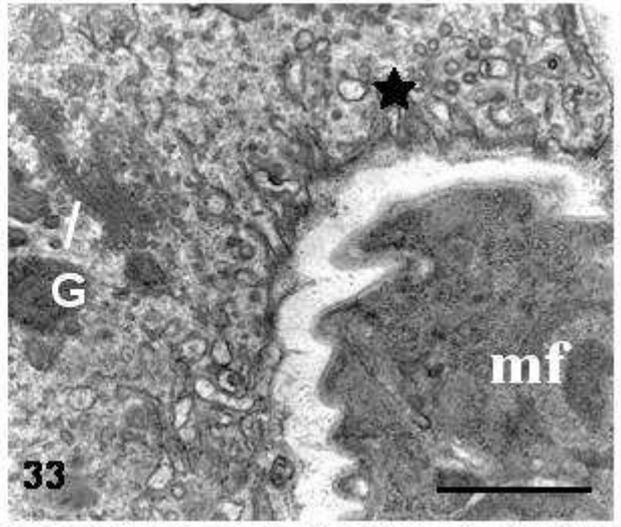
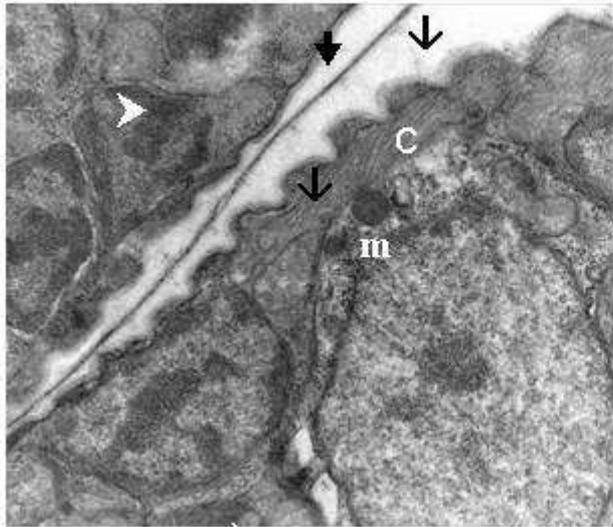


Figs. 32-35: Microscopia eletrônica de transmissão das fêmeas de *Litomosoides chagasfilhoi* (controle).

Fig. 32. Detalhe de microfilárias apresentando uma cutícula (c) com estriações cuticulares transversais (seta fina), uma fina camada muscular abaixo desta (m) e diversos núcleos (cabeça de seta). Envolvendo cada microfilária há a presença de uma bainha (seta). Barra 1 μm .

Fig. 33. Detalhe de uma microfilária (mf) apresentando sua bainha em contato com o epitélio uterino. O epitélio apresenta, na região de contato com a microfilária, uma grande quantidade de vesículas (estrela). N, núcleo; seta fina, estriações cuticulares. Barra 2 μm

Figs 34 e 35. Parede intestinal envolvida por uma lâmina basal (cabeça de seta). Entre as células intestinais há a presença de junções septadas (JS), e no interior de cada célula intestinal há a presença de vacúolos (V) e inclusões lipídicas (L). LU, lúmen; mv, microvilosidades. Barra 2 μm .



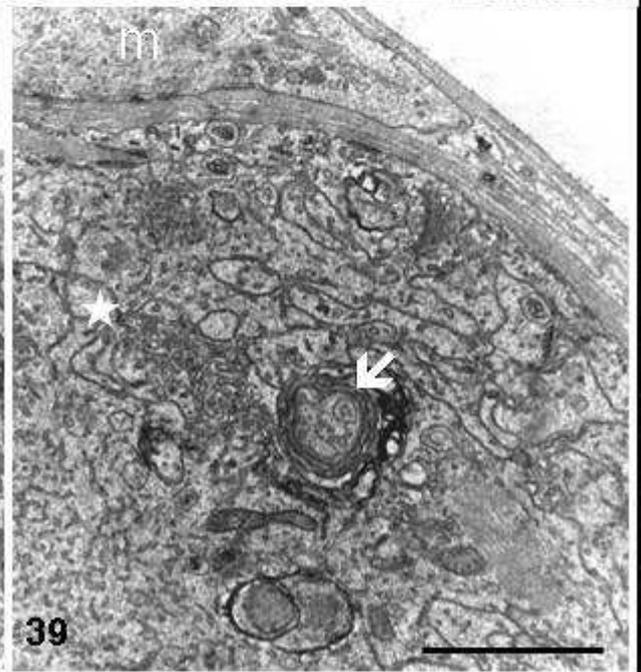
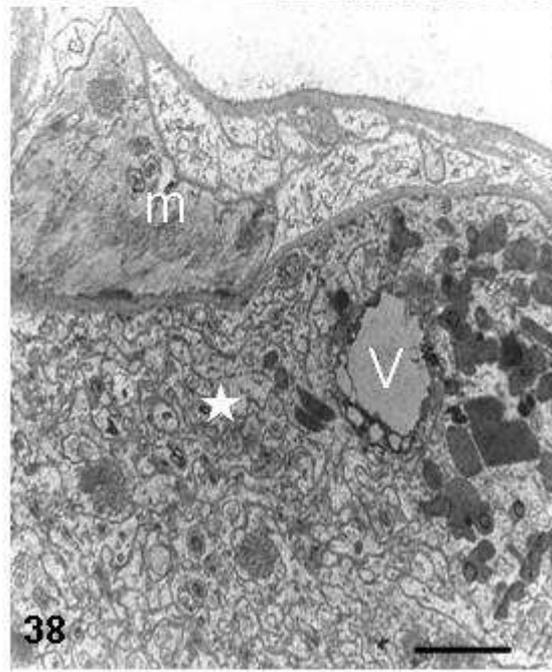
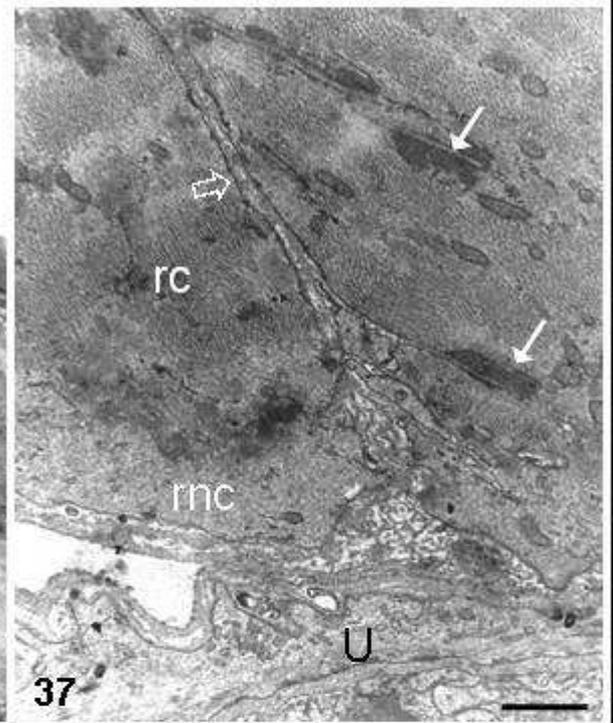
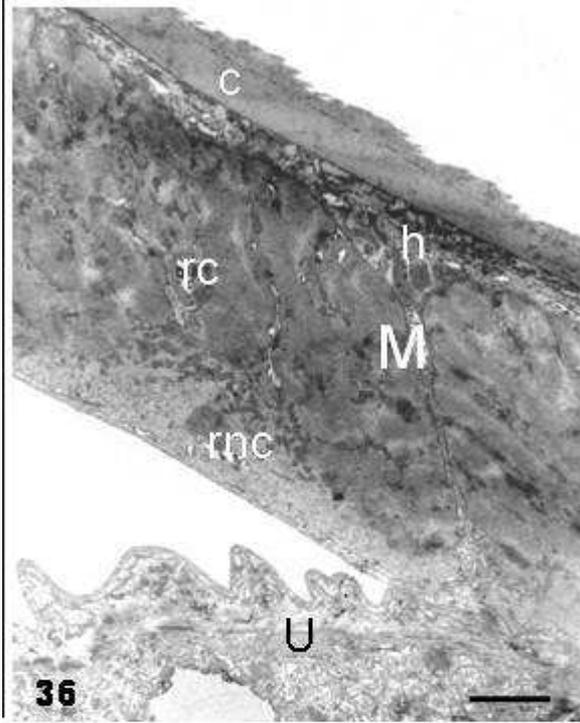
Figs 36-39. Microscopia eletrônica de transmissão das fêmeas de *Litomosoides chagasfilhoi* submetidas à ação de 40 mg de albendazol

Fig. 36. Corte oblíquo da parede do corpo formada por cutícula (C), hipoderme (h) e camada muscular (M), não apresentando nenhuma alteração. Cada fibra muscular apresenta uma região contrátil (rc) e uma região não-contrátil (rnc). O útero (U) se encontra adjacente à parede do corpo. Barra 0,5 μm .

Fig. 37. Corte oblíquo da camada muscular apresentando uma região contrátil (rc) e uma região não-contrátil (rnc). Cada fibra muscular apresenta corpos densos em meio as miofibrilas (seta fina) e é envolvida por uma lâmina basal (seta grossa). U, útero. Barra 0,5 μm .

Fig. 38. Parede uterina apresentando quantidade aumentada de invaginações de membrana na região do labirinto baso-lateral (estrela), além da presença de vesículas (V). M, camada muscular da parede uterina. Barra 2 μm .

Fig. 39. Parede uterina apresentando quantidade aumentada de invaginações de membrana na região do labirinto baso-lateral (estrela), havendo a formação de corpos de mielina (seta). M, camada muscular da parede uterina. Barra 2 μm .



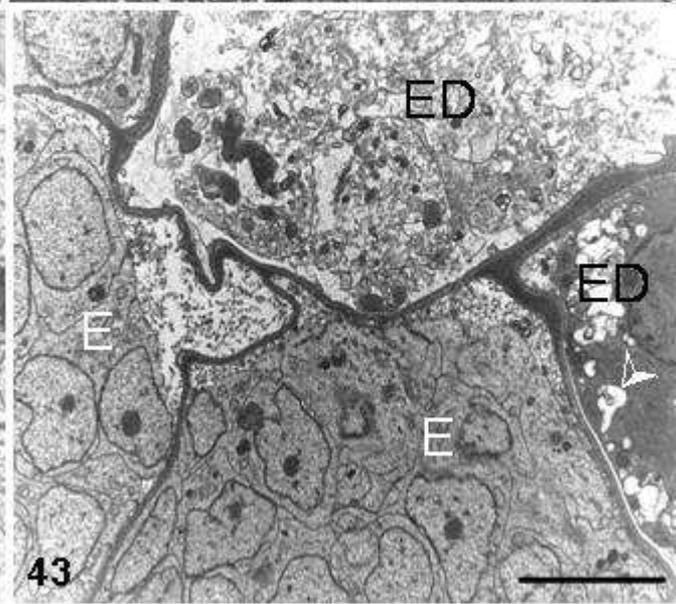
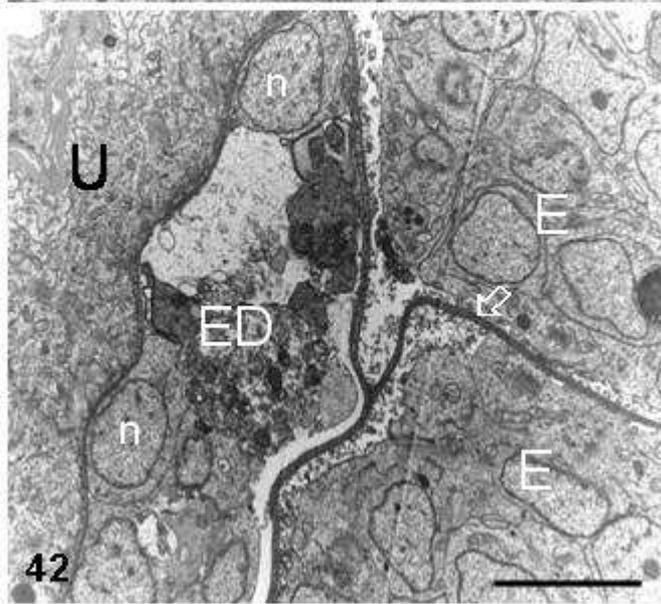
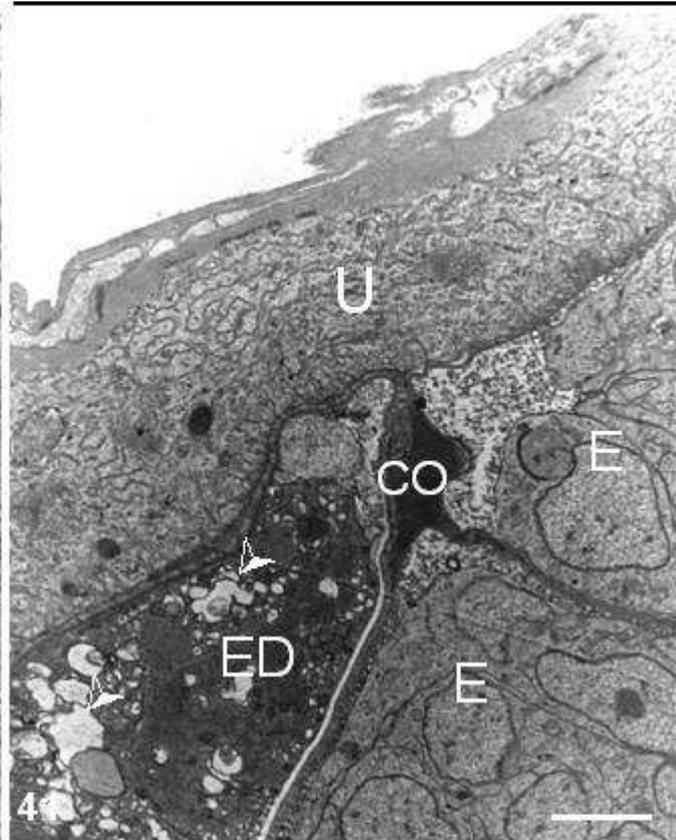
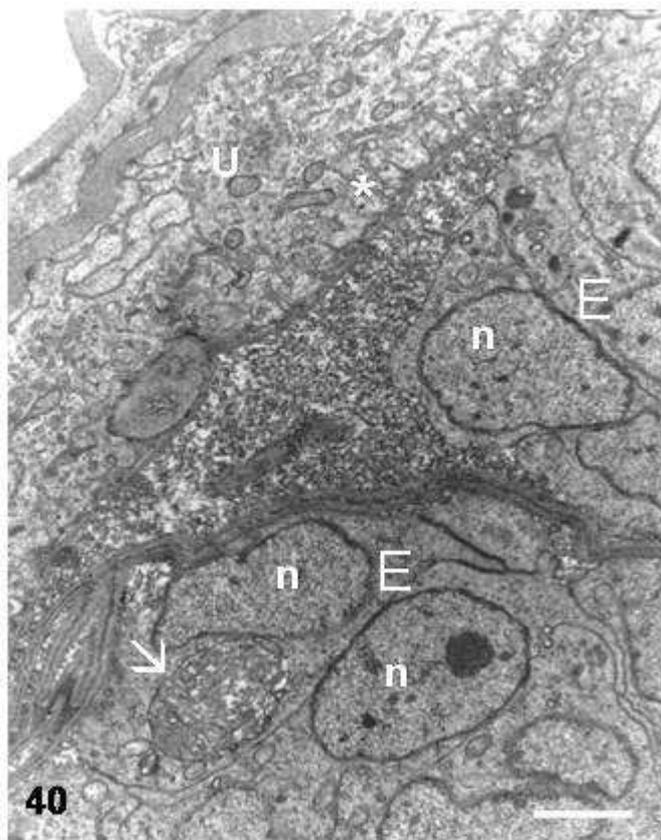
Figs 40-43. Microscopia eletrônica de transmissão das fêmeas de *Litomosoides chagasfilhoi* submetidas à 40 mg de albendazol.

Fig. 40. Presença de embriões (E) em desenvolvimento no útero. Cada embrião apresenta em seu interior uma grande quantidade de núcleos (n). Foi possível observar a presença de uma vesícula (seta). A membrana da parede uterina (U) próxima ao lúmen, que está em contato com a casca do ovo dos embriões apresentou uma grande quantidade de vesículas (asterisco). Barra 0,5 μm .

Fig. 41. Útero (U) apresentando um embrião degenerado (ED) com diversos vacúolos (cabeça de seta) em meio a embriões íntegros (E). Cada embrião era envolvido por uma casca de ovo (CO). Barra 0,5 μm .

Fig. 42. Presença de um embrião em degeneração (ED) no útero (U), sendo possível observar alguns núcleos (n) em seu interior. Diversos embriões inalterados foram observados (E). Seta larga, casca do ovo. Barra 1 μm .

Fig. 43. Embriões degenerados (ED) apresentando vacúolos (cabeça de seta) em meio a embriões íntegros (E). Barra 1 μm .



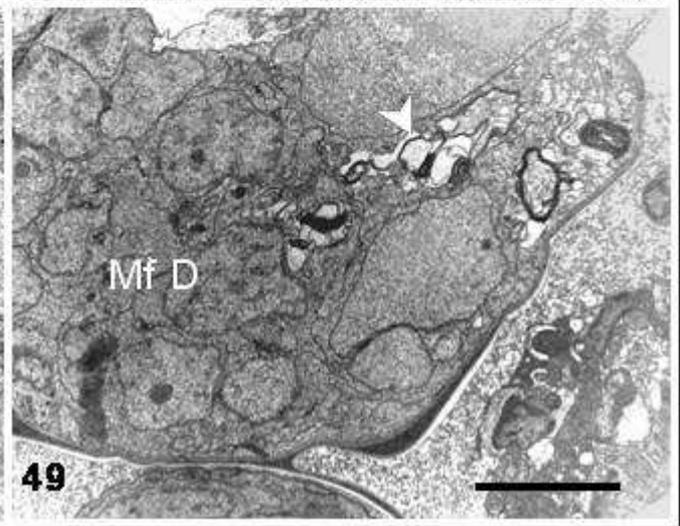
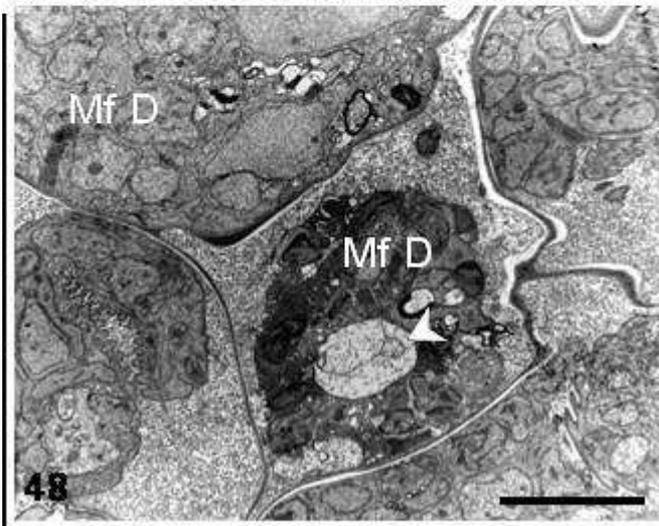
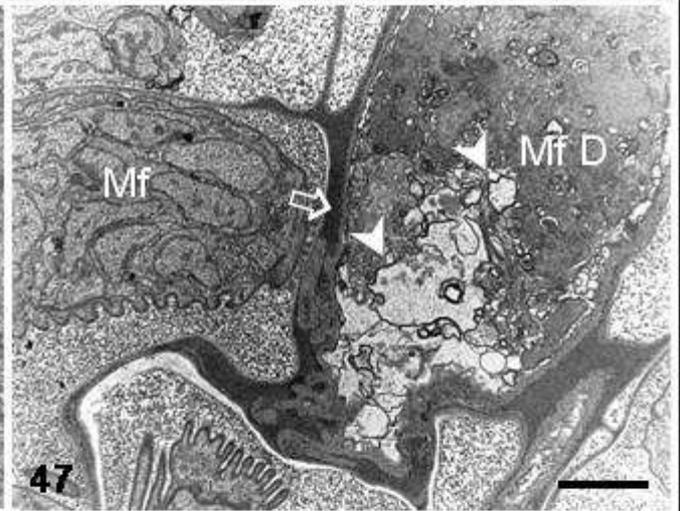
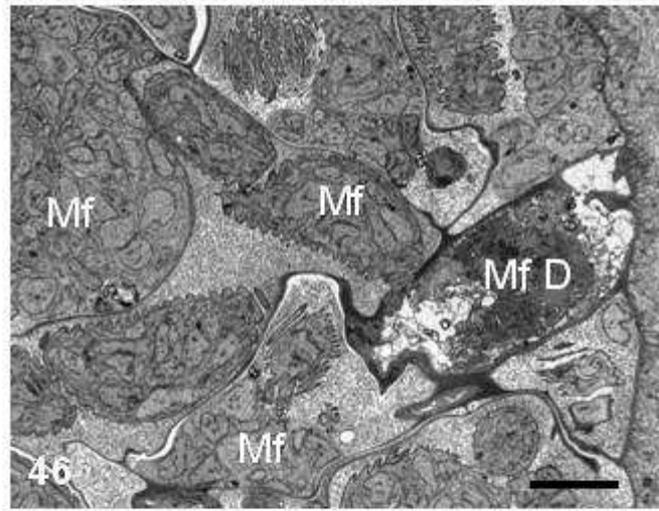
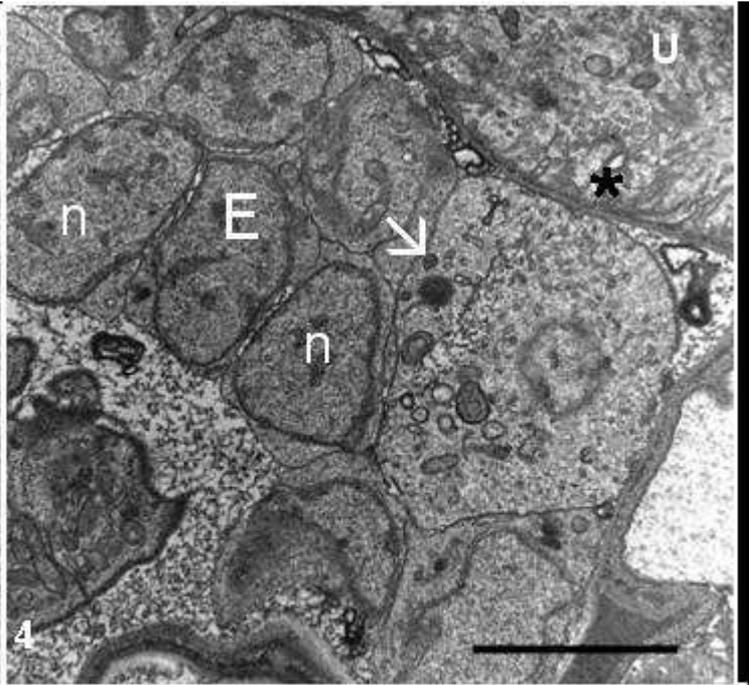
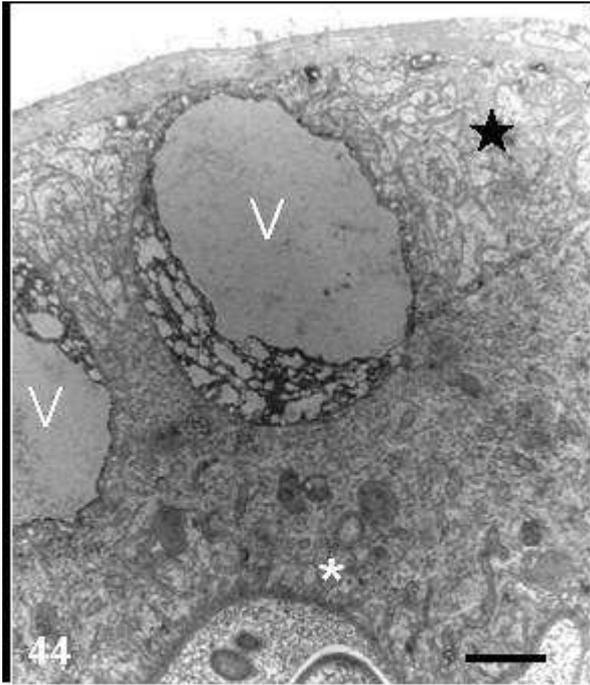
Figs. 44-49. Microscopia eletrônica de transmissão do sistema reprodutivo das fêmeas de *Litomosoides chagasfilhoi* submetidas à 40 mg de albendazol.

Fig. 44. Parede do útero apresentando vesículas (V) na região do labirinto baso-lateral (estrela). Na região próxima ao lúmen, há a presença de vesículas (asterisco). Barra 0,5 μm .

Fig. 45. Embrião (E) sendo possível observar diversos núcleos (n) iniciando seu processo de degeneração (seta). Na região do útero (U) havia a presença de diversas vesículas (asterisco). Barra 2 μm .

Fig. 46 e 47. Microfilárias presentes na região proximal do útero da fêmea. Foi possível observar várias microfilárias íntegras (Mf) e uma microfilária desintegrada (Mf D) apresentando vacúolos (cabeça de seta). Seta grossa vazada, bainha. Barras 5 μm e 2 μm , respectivamente.

Fig. 48 e 49. Microfilárias iniciando seu processo de degeneração (Mf D) apresentando vacúolos (cabeça de seta). Barras 1 μm



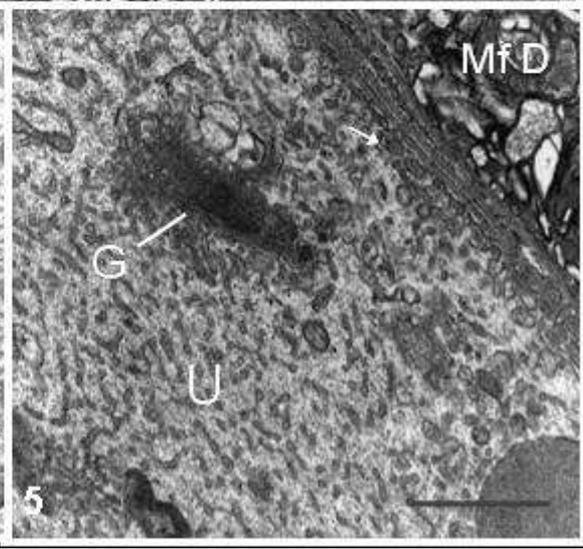
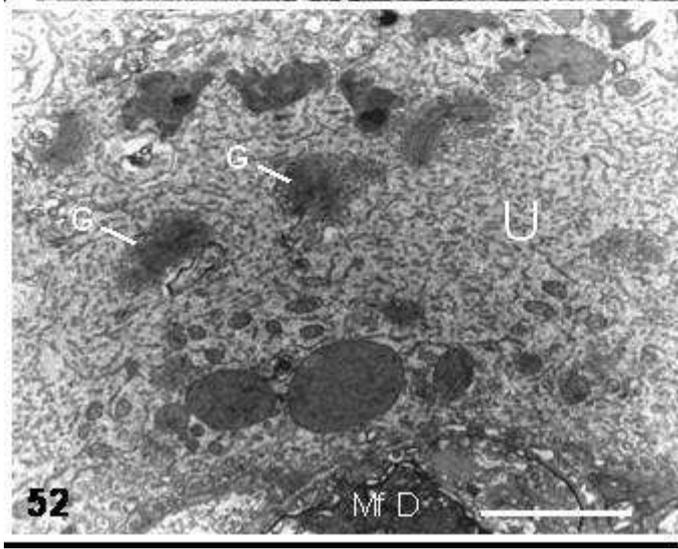
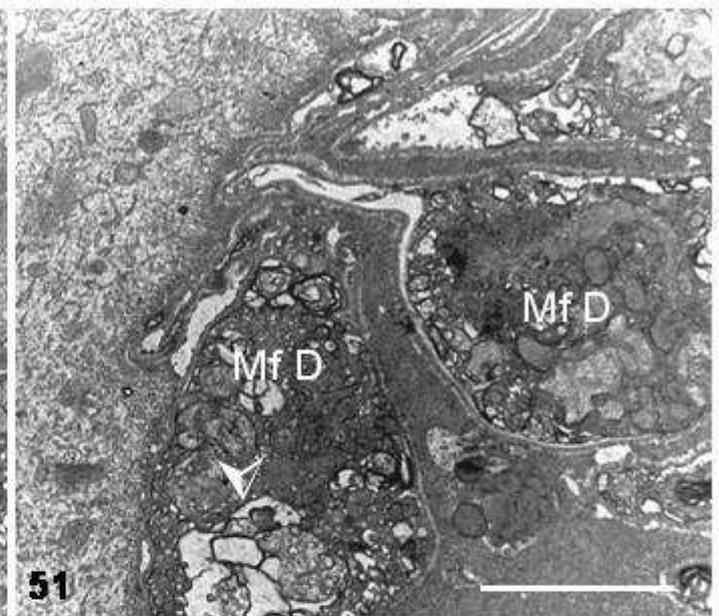
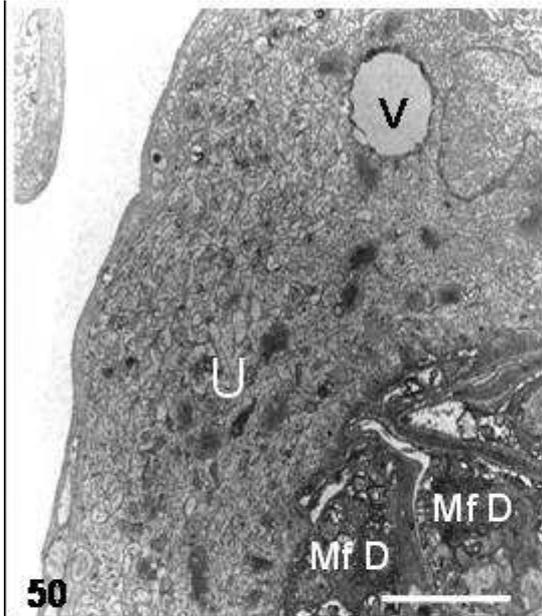
Figs. 50-53. Microscopia eletrônica de transmissão do sistema reprodutivo das fêmeas de *Litomosoides chagasfilhoi* submetidas à 40 mg de albendazol.

Fig. 50. Parede do útero (U) apresentando vesículas (V) e diversas microfilárias destruídas em seu interior (Mf D). Barra 1 μm .

Fig. 51. Microfilárias destruídas (Mf D) apresentando diversos vacúolos (cabeça de seta). Barra 1 μm .

Fig. 52. Parede do útero (U) apresentando uma grande quantidade de complexo de Golgi (G). Barra 2 μm .

Fig. 53. Detalhe do epitélio uterino apresentando complexo de Golgi (G) e diversas vesículas (seta fina) na região de contato com as microfilárias degeneradas (Mf D). Barra 1 μm .

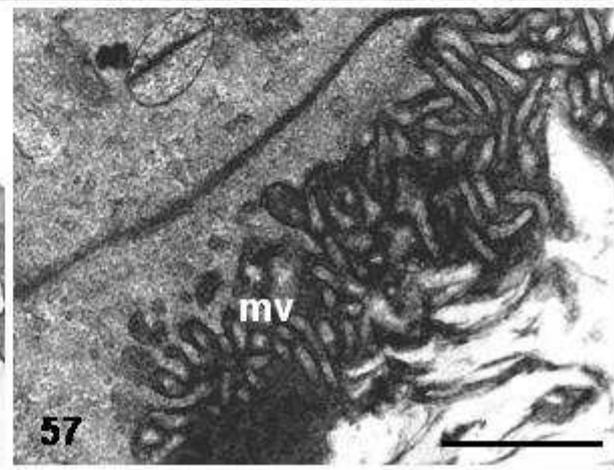
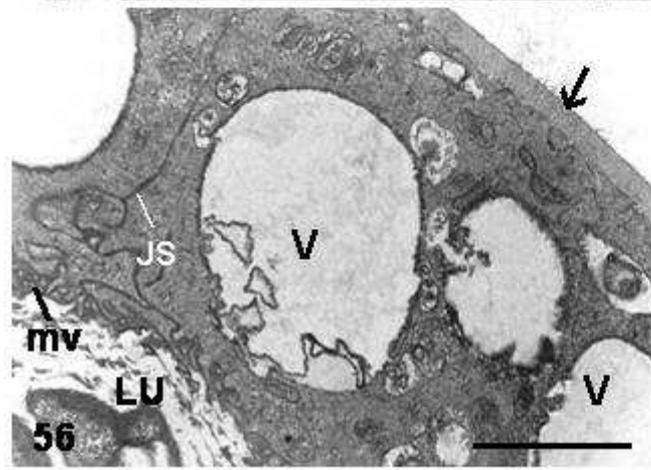
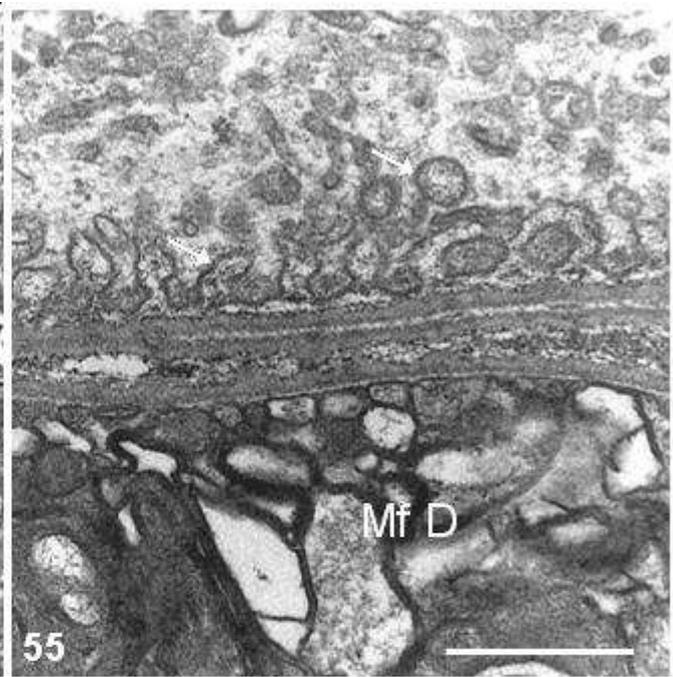
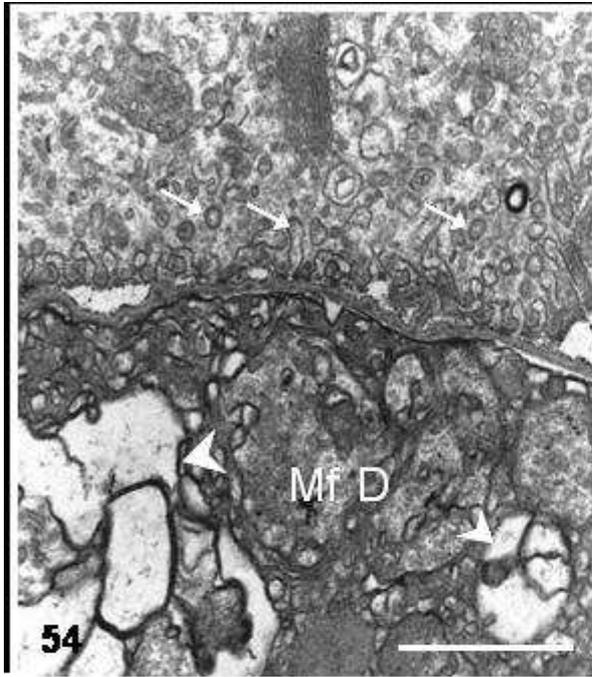


Figs. 54-57. Microscopia eletrônica de transmissão das fêmeas de *Litomosoides chagasfilhoi* submetidas à ação de 40 mg de albendazol

Fig. 54 e 55. Microfilárias degeneradas (Mf D) apresentando uma série de vacúolos (cabeça de seta) havendo a formação de regiões bastante eletróluscentes em meio a regiões eletrondensas. Barras 1 μm .

Fig. 56. Parede intestinal envolvida por uma lâmina basal (seta fina), e composta por células epiteliais entre as quais há a presença de junções septadas (JS). No interior de cada célula intestinal há a presença de vacúolos (V). mv, microvilosidades; LU, lúmen. Barra 1 μm .

Fig. 57. Detalhe das microvilosidades (mv) presentes no lúmen da parede intestinal. Barra 0,5 μm .



Figs. 58-63. Microscopia eletrônica de transmissão das fêmeas de *Litomosoides chagasfilhoi* submetidas à ação de 80 mg de albendazol

Fig. 58. Parede do corpo formada por cutícula (C), hipoderme (h) e camada muscular (M). Cada fibra muscular possui uma região contrátil (rc) e uma região não-contrátil (rnc). Barra 1 μm .

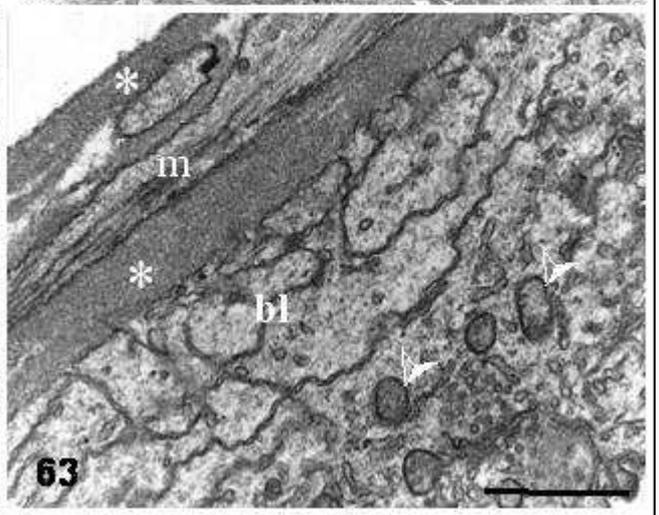
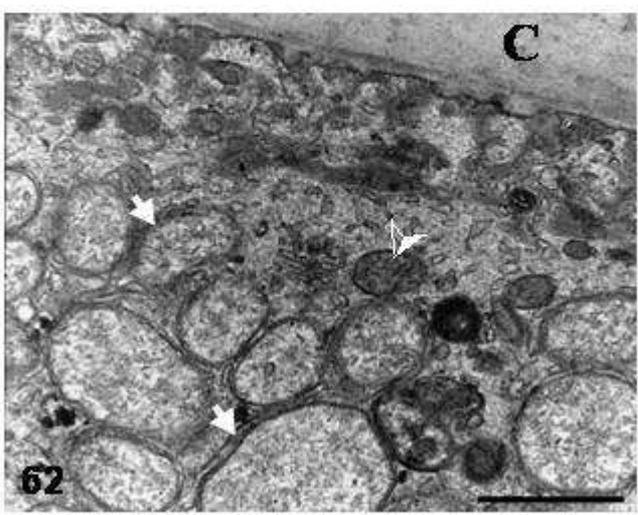
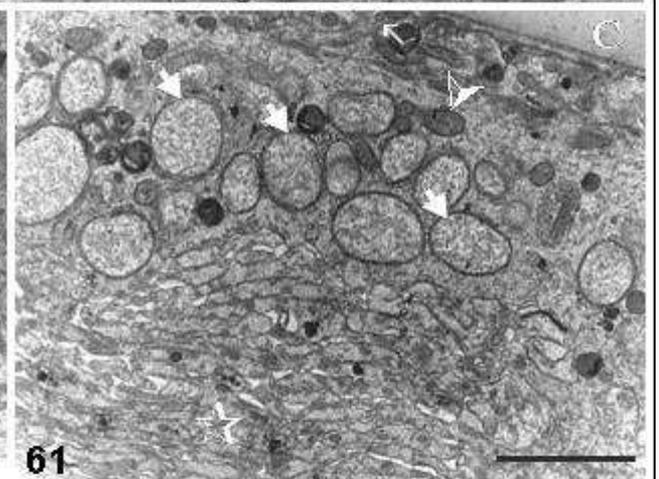
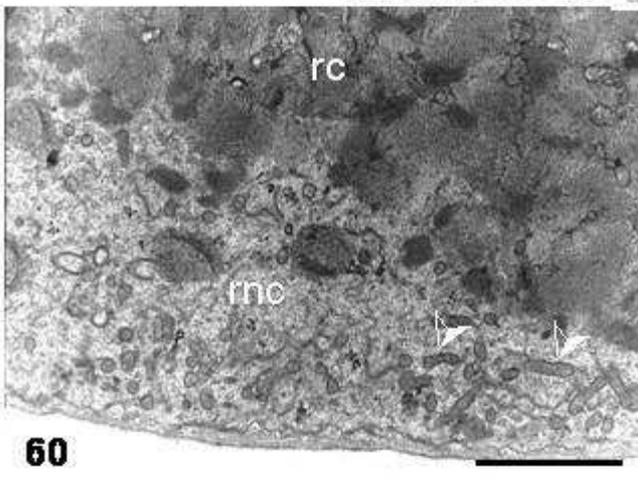
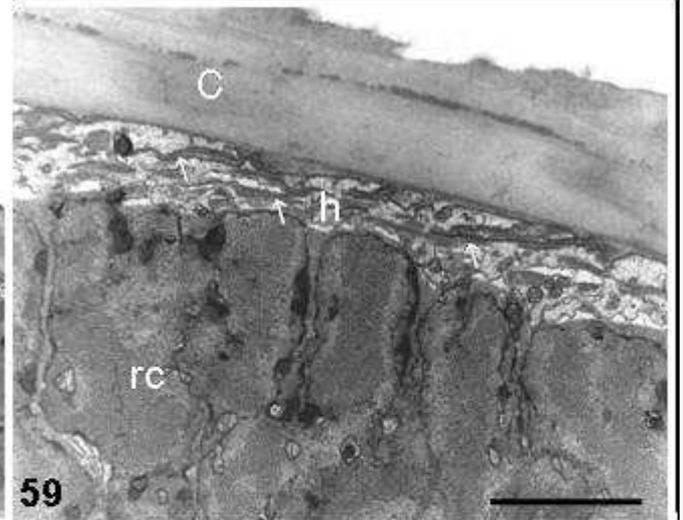
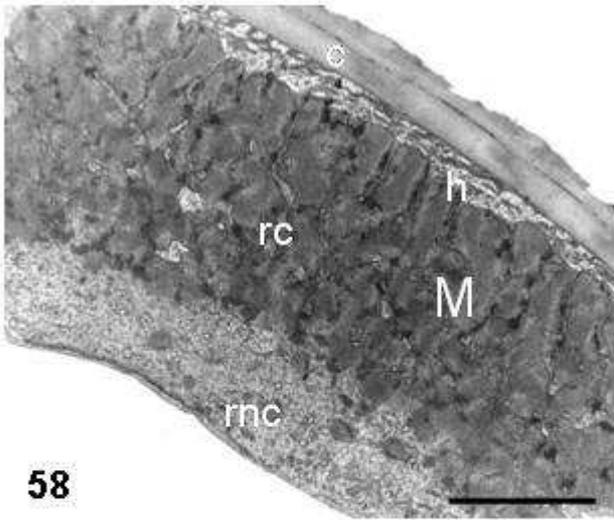
Fig. 59. Detalhe da cutícula (C), da hipoderme apresentando membranas convolutas (seta fina) e da região contrátil da camada muscular (rc). Barra 1 μm .

Fig. 60. Camada muscular apresentando uma região contrátil (rc) e uma região não-contrátil (rnc) contendo perfis mitocondriais (cabeça de seta). Barra 1 μm .

Fig. 61. Cordão hipodermal apresentando cutícula (C), membranas convolutas logo abaixo desta (seta fina), perfis mitocondriais (cabeça de seta) e muitas bactérias (seta). A região mais próxima do pseudoceloma apresenta um aspecto esponjoso (estrela). Barra 1 μm .

Fig. 62. Detalhe das bactérias presentes no interior do cordão hipodermal (seta) e de perfis mitocondriais (cabeça de seta). C, cutícula. Barra 1 μm .

Fig. 63. Parede uterina apresentando uma fina camada muscular (m) envolvida por uma lâmina basal (asterisco). Abaixo desta lâmina basal há o epitélio uterino que apresenta um labirinto baso-lateral (bl) além de diversos perfis mitocondriais (cabeça de seta). Barra 1 μm .



Figs 64-69. Microscopia eletrônica de transmissão do sistema reprodutor feminino de *Litomosoides chagasfilhoi* submetidas à ação de 80 mg de albendazol

Fig. 64. Parede uterina (U) apresentando uma fina camada muscular (m) e a região do labirinto baso-lateral (bl) bem visíveis. No seu interior há a presença de microfilárias degeneradas (Mf D). Barra 1 μm .

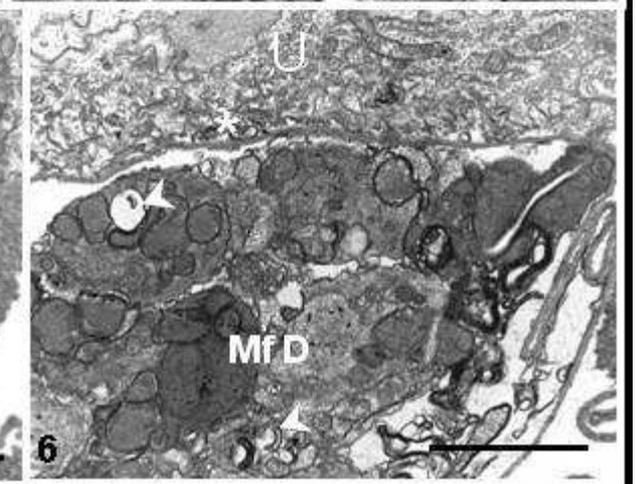
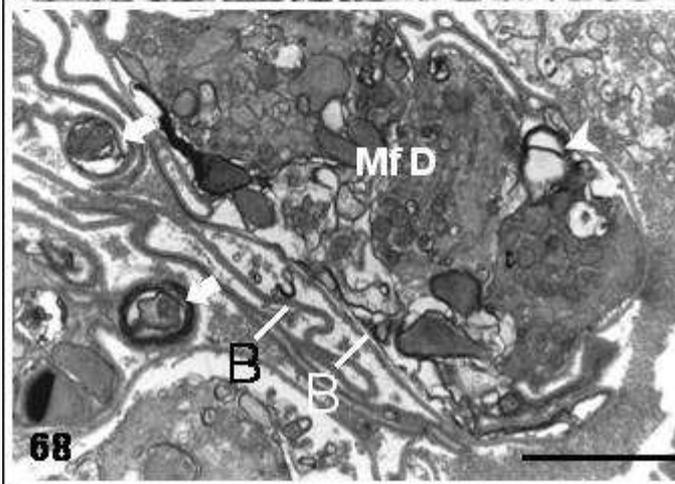
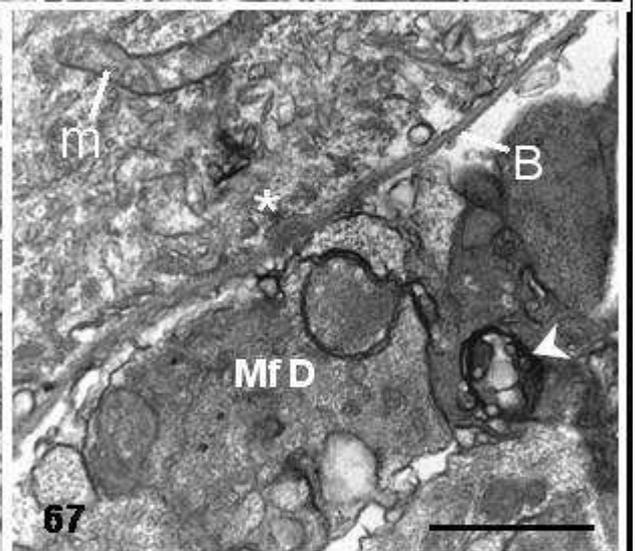
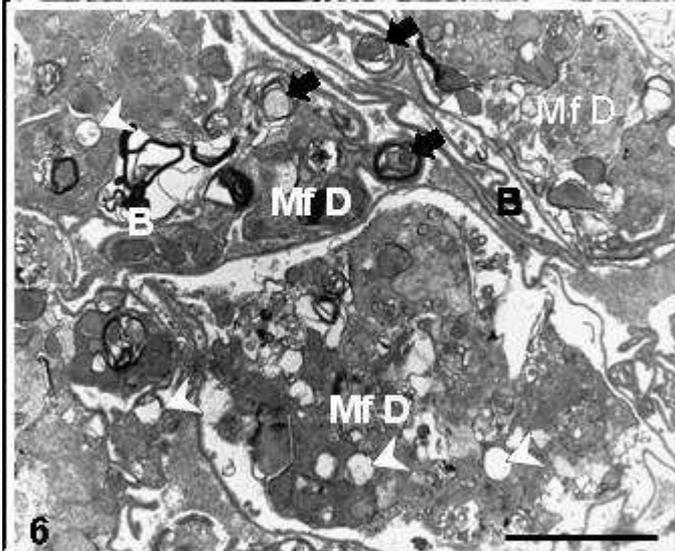
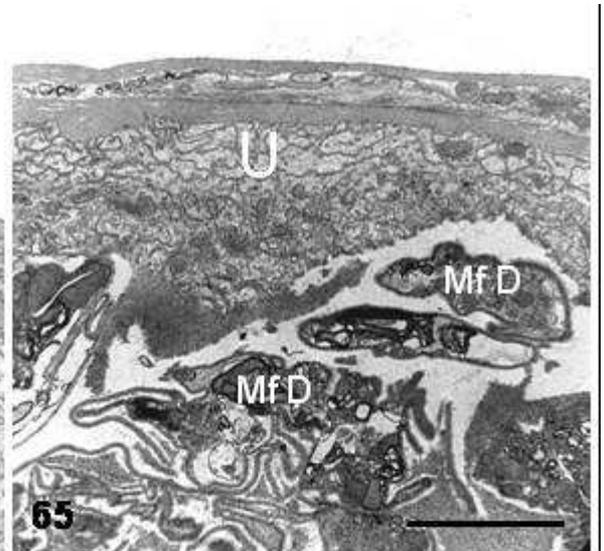
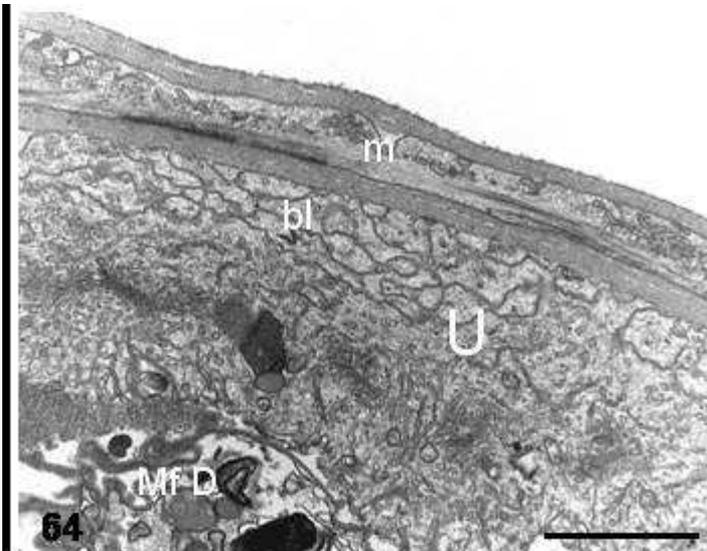
Fig. 65. Presença de diversas microfilárias degeneradas (Mf D) no interior do útero. Não foi observada nenhuma microfilária íntegra após o tratamento. Barra 1 μm .

Fig. 66. Microfilárias destruídas (Mf D) apresentando diversos vacúolos (cabeça de seta). Em algumas regiões foi possível observar figuras de mielina sendo formados (seta larga). B, bainha. Barra 1 μm .

Fig. 67. Detalhe de uma microfilária destruída apresentando um conteúdo eletrondenso e a formação de vacúolos (cabeça de seta). Na região em que o epitélio uterino faz contato com a bainha (B) não foram observadas vesículas (asterisco). m, perfil mitocondrial. Barra 1 μm .

Fig. 68. Microfilária com completa desorganização celular (Mf D) apresentando vacúolos (cabeça de seta). Figuras de mielina estavam sendo formadas (seta larga). A bainha (B) apresenta um aspecto diferente do observado no controle (B). Barra 1 μm .

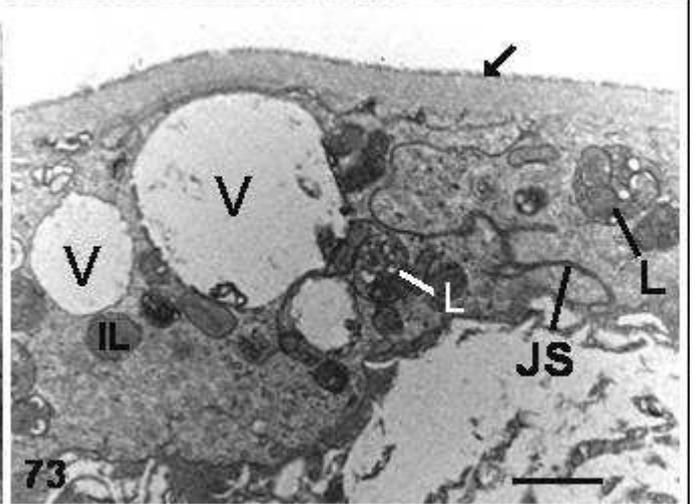
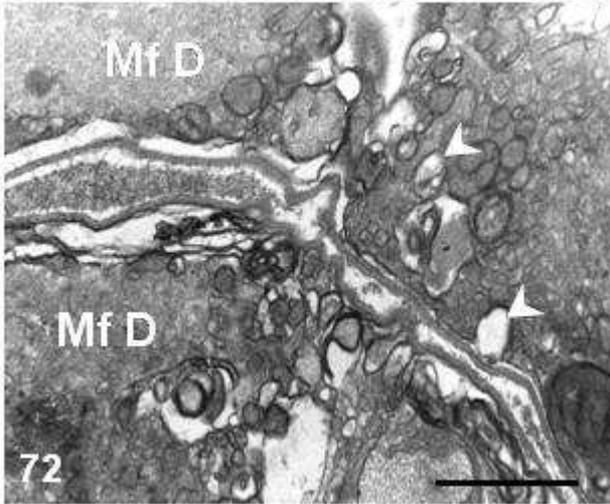
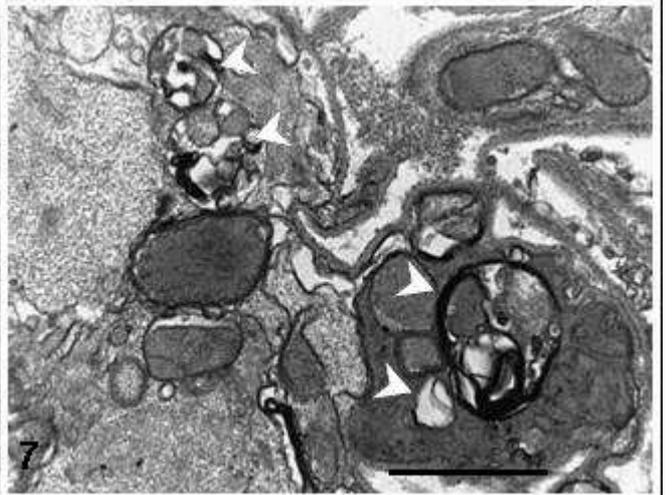
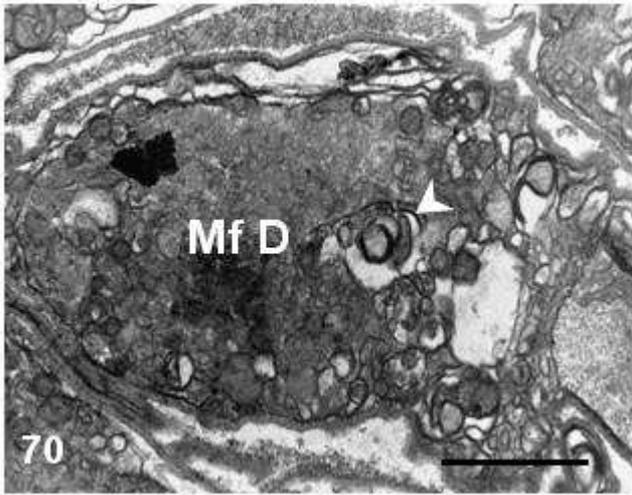
Fig. 69. Microfilária destruída apresentando um conteúdo eletrondenso e a formação de vacúolos (cabeça de seta). Na região em que o epitélio uterino faz contato com a bainha não foram observadas vesículas (asterisco). U, útero. Barra 1 μm .



Figs 70-73. Microscopia eletrônica de transmissão das fêmeas de *Litomosoides chagasfilhoi* submetidas à ação de 80 mg de albendazol

Fig. 70-72. Microfilárias degeneradas apresentando vacúolos (cabeça de seta). Barra 1 μm .

Fig. 73. Parede intestinal envolvida por uma lâmina basal (seta fina). Entre as células intestinais há a presença de junções septadas, e no interior de cada célula intestinal há a presença de vacúolos (V), inclusões lipídicas (IL) e corpos lisossomais (L). Barra 0,5 μm .



Figs 74-79. Microscopia eletrônica de transmissão das fêmeas de *Litomosoides chagasfilhoi* submetidas à ação de 6 mg/ kg de DEC

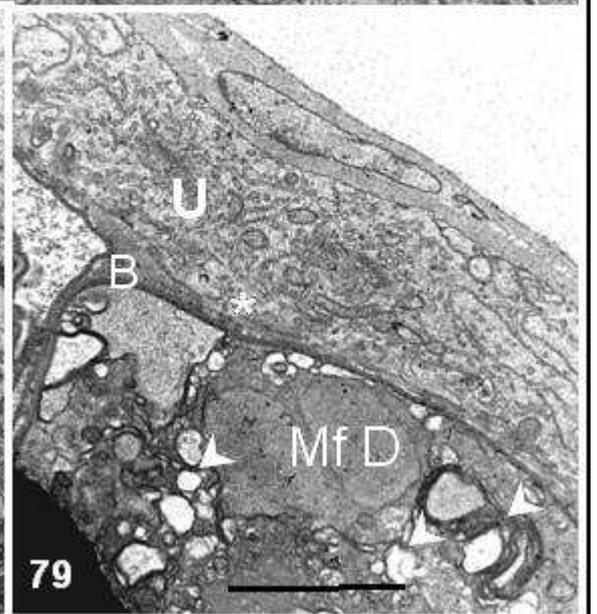
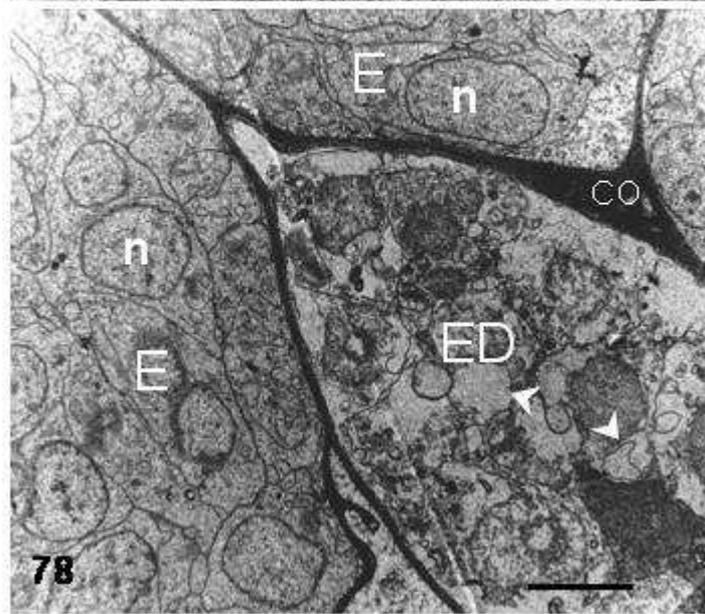
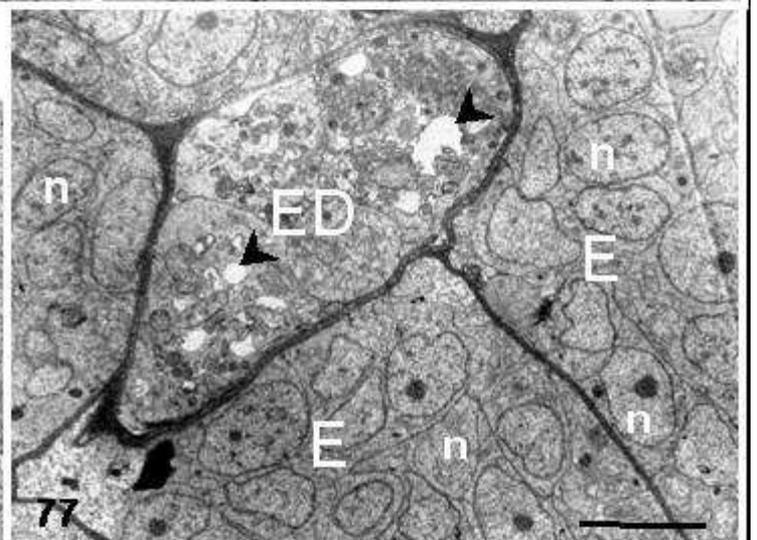
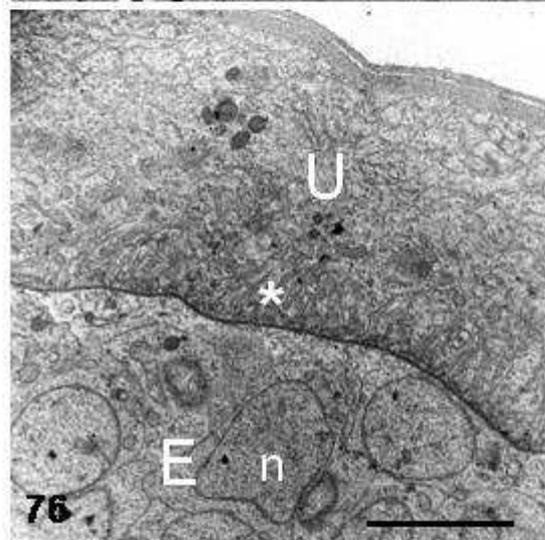
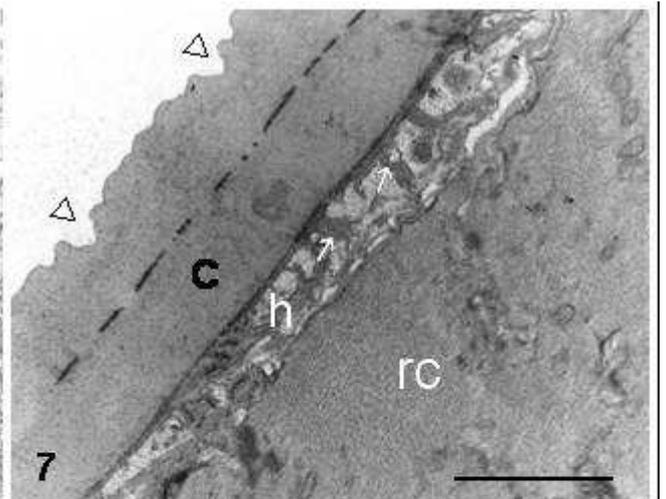
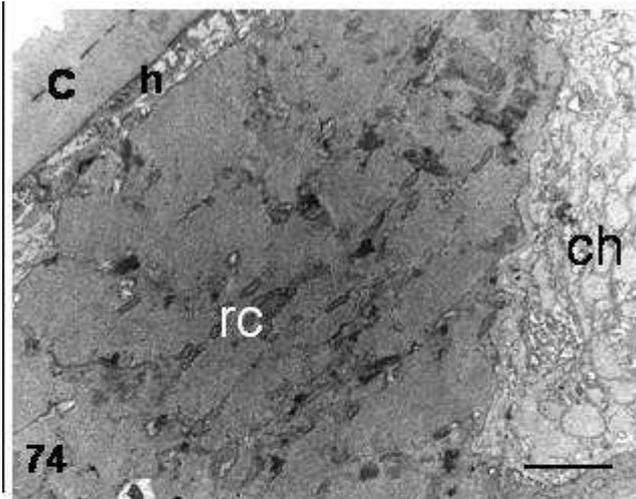
Fig. 74. Corte longitudinal da parede do corpo de *L. chagasfilhoi* sendo possível observar a cutícula (C), hipoderme (h) e a região contrátil da camada muscular (rc). Também foi possível observar parte do cordão hipodermal (ch). Barra 2 μ m.

Fig. 75. Detalhe da cutícula (C), hipoderme (h) e região contrátil da camada muscular (rc). A cutícula apresenta diversas estriações (cabeça de seta). Na hipoderme foram observadas membranas convolutas (seta fina). Barra 2 μ m.

Fig. 76. Parede do útero (U) apresentando embrião íntegro em seu interior (E). Na região em que o epitélio uterino faz contato com o embrião há a presença de vesículas (asterisco). Barra 2 μ m.

Fig. 77 e 78. Embriões degenerados (ED) em meio a diversos embriões íntegros (E). Nos embriões íntegros foram observados diversos núcleos, mas nos embriões degenerados nenhuma organela pôde ser diferenciada, havendo apenas a presença de vacúolos (cabeça de seta). CO, casca do ovo. Barra 2 μ m.

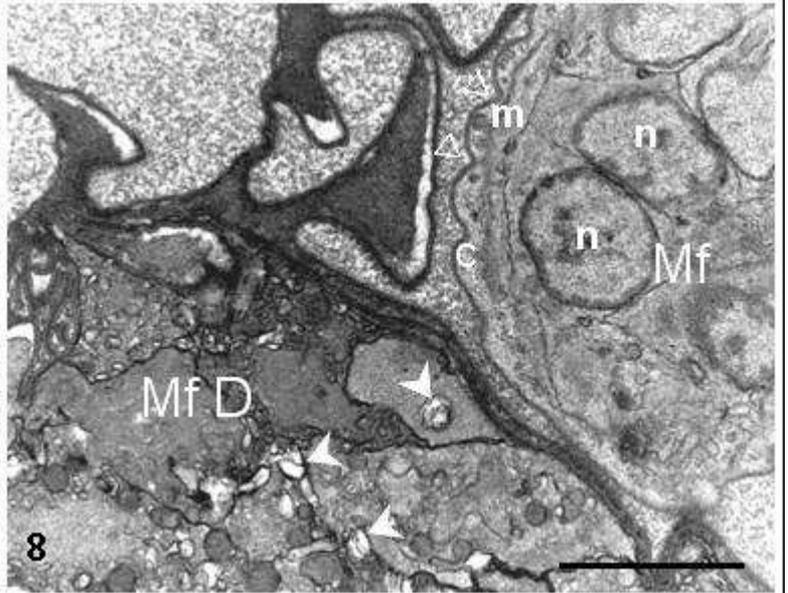
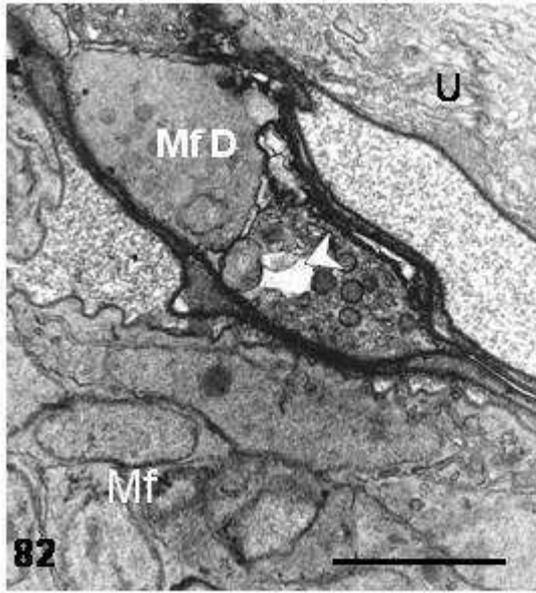
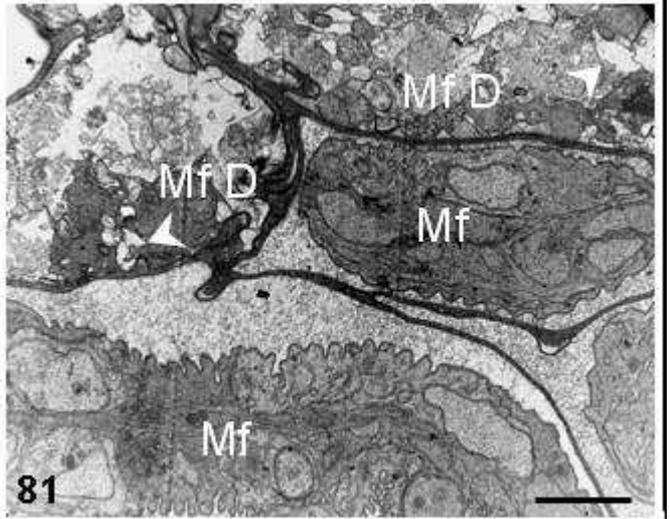
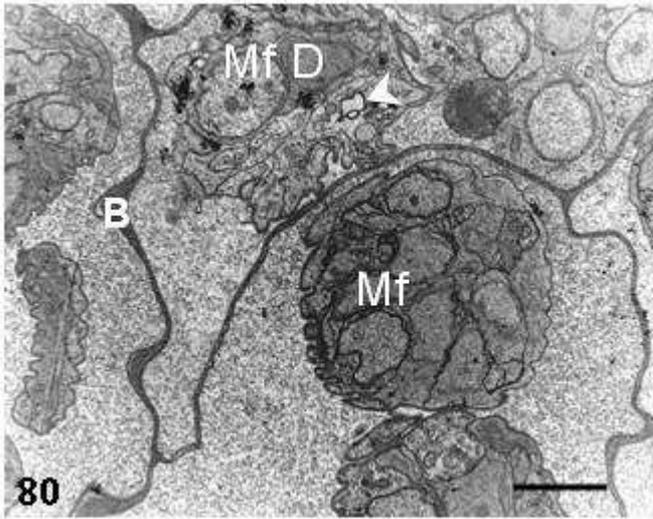
Fig. 79. Microfilária degenerada (Mf D) apresentando diversos vacúolos (cabeça de seta), sendo envolta pela bainha (B). A região do útero (U) adjacente à microfilária não apresentava vesículas (asterisco). Barra 2 μ m.



Figs. 80-83. Microscopia eletrônica de transmissão do útero das fêmeas contendo microfilárias de *L. chagasfilhoi* após o tratamento com 6 mg/ kg de DEC

Figs. 80 a 82. Microfilárias íntegras (Mf) em meio a microfilárias danificadas pela droga (Mf D). As microfilárias danificadas apresentam diversos vacúolos (cabeça de seta). B, bainha; U, útero. Barra 2 μ m.

Fig. 83. Detalhe de uma microfilária degenerada (Mf D) apresentando diversos vacúolos (cabeça de seta) e de uma microfilária íntegra (Mf) sendo possível distinguir uma cutícula (C) com estriações cuticulares (cabeça de seta vazada), uma fina camada muscular logo abaixo desta (m) e diversos núcleos em seu interior (n). Barra 2 μ m.



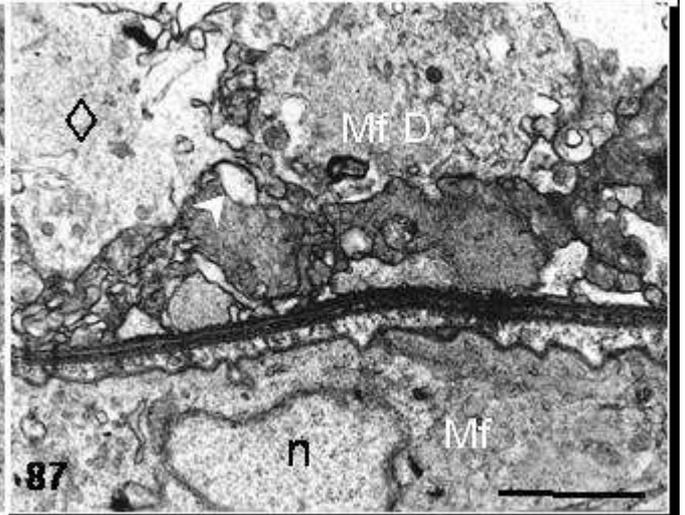
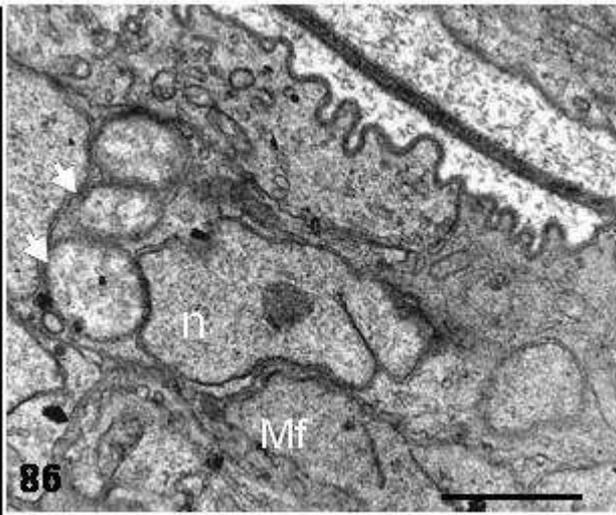
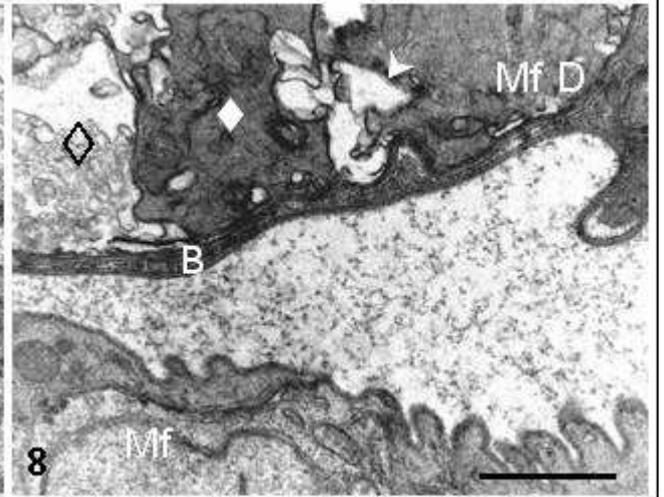
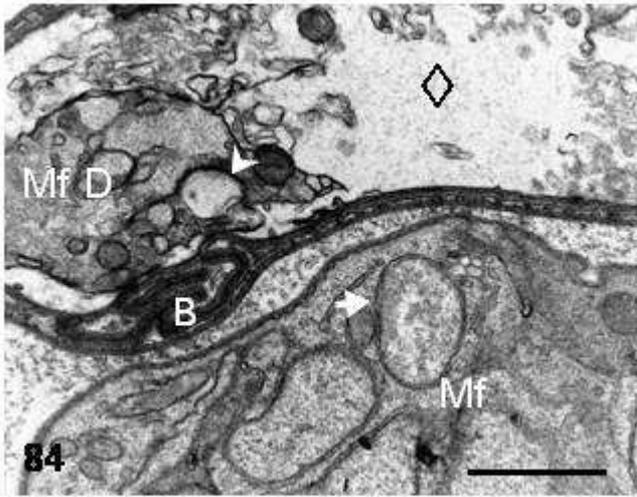
84-87. Microscopia eletrônica de transmissão das fêmeas de *L. chagasfilhoi* após o tratamento com 6 mg/ kg de DEC

Fig. 84. Microfilária degenerada (mf D) apresentando vacúolos (cabeça de seta) e regiões bastante eletróluscentes (losango) não sendo possível diferenciar nenhuma organela. Na microfilária íntegra (Mf), foi possível observar a presença de bactéria (seta). B, bainha. Barra 1 μ m.

Fig. 85. Microfilária degenerada (Mf D) apresentando vacúolos (cabeça de seta) e regiões bastante eletróluscentes (losango vazado) e outras bastante eletrondensas (losango branco) não sendo possível diferenciar nenhuma organela. Mf, microfilária íntegra; B, bainha. Barra 1 μ m.

Fig. 86. Microfilária sem alteração (Mf) apresentando núcleo (n) e diversas bactérias em seu interior (seta). Barra 1 μ m.

Fig. 87. Microfilária degenerada (Mf D) apresentando vacúolos (cabeça de seta) e regiões bastante eletróluscentes (losango vazado) não sendo possível diferenciar nenhuma organela. Mf, microfilária íntegra; n, núcleo. Barra 1 μ m.



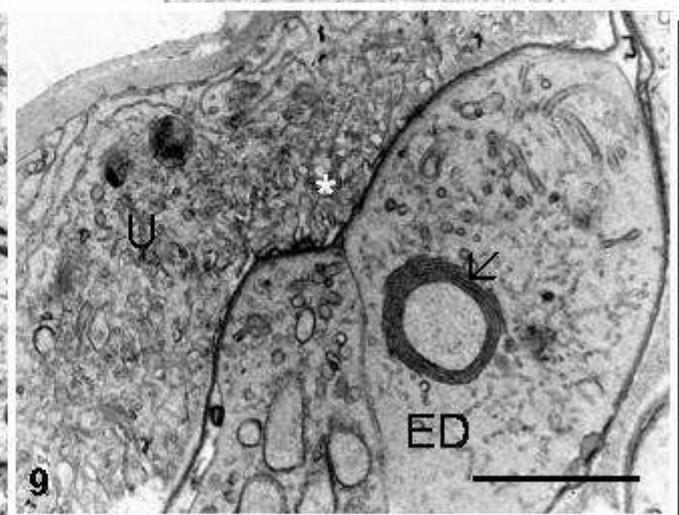
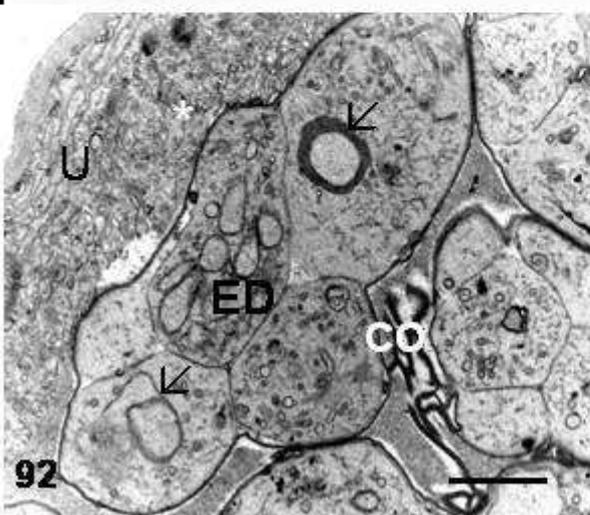
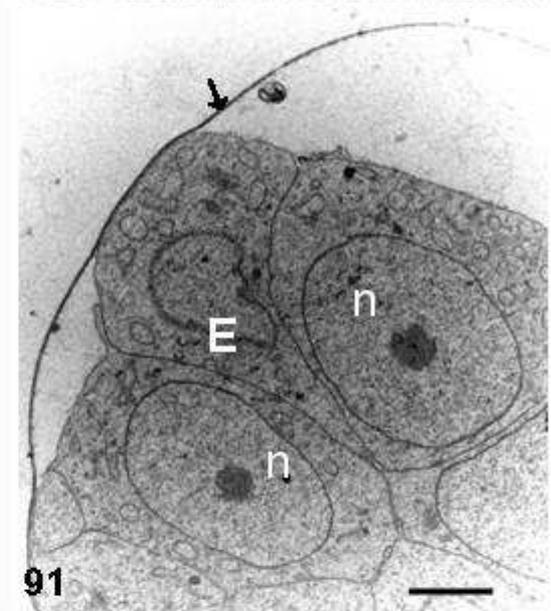
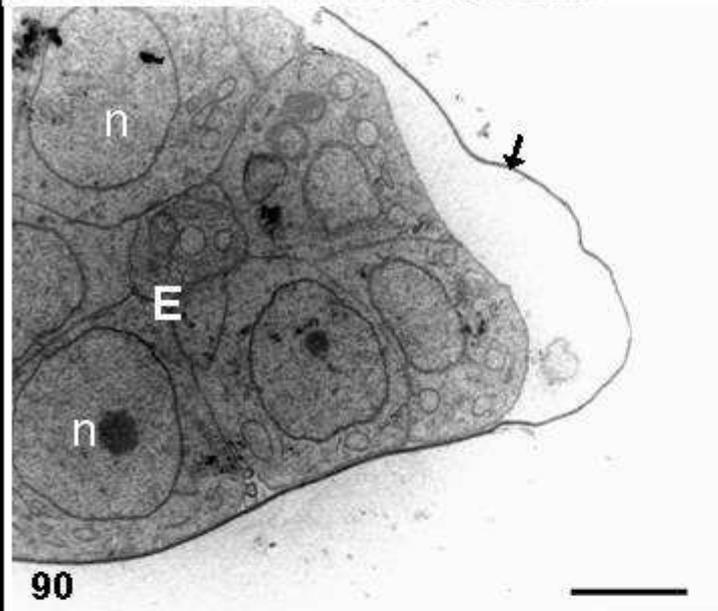
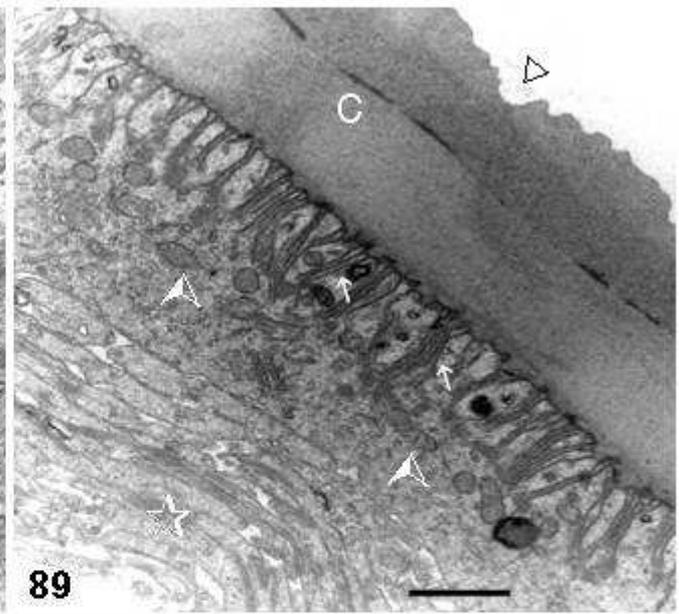
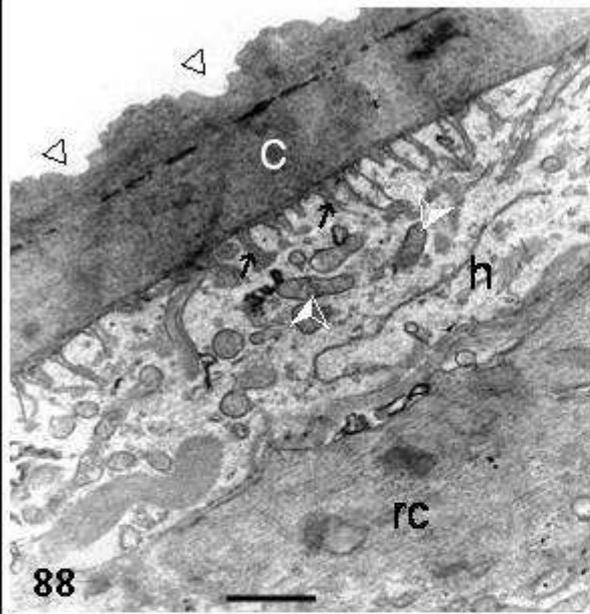
Figs 88-93. Microscopia eletrônica de transmissão das fêmeas de *L. chagasfilhoi* tratados com 12 mg/kg de DEC

Fig. 88. Detalhe da cutícula (C), da hipoderme apresentando membranas convolutas (seta fina) e perfis mitocondriais (cabeça de seta) e da região contrátil da camada muscular (rc). Barra 0,5 μm .

Fig. 89. Corte longitudinal do cordão hipodermal apresentando cutícula (C) com estriações cuticulares evidentes (cabeça seta vazada). Logo abaixo da cutícula há diversas membranas convolutas (seta fina) e perfis mitocondriais (cabeça de seta). Na região mais próxima do pseudoceloma apresenta um aspecto esponjoso (estrela). Barra 0,5 μm .

Figs. 90 e 91. Embriões no início de seu desenvolvimento apresentando diversas células com núcleo (n). A casca do ovo estava bem visível (seta). Não foi observada nenhuma alteração causada pela droga. Barra 0,5 μm .

Figs. 92 e 93. Útero (U) apresentando embriões degenerados em seu interior (ED), sendo possível observar figuras de mielina (seta) e casca do ovo de aspecto alterado (CO). Asterisco, região de contato do útero com o embrião. Barra 0,5 μm .

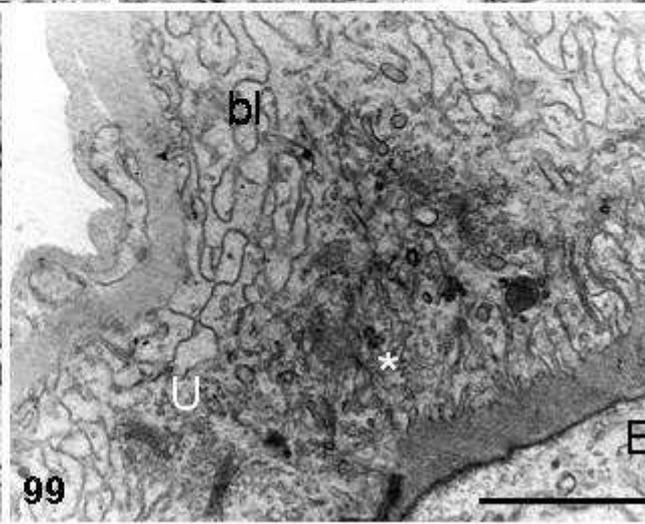
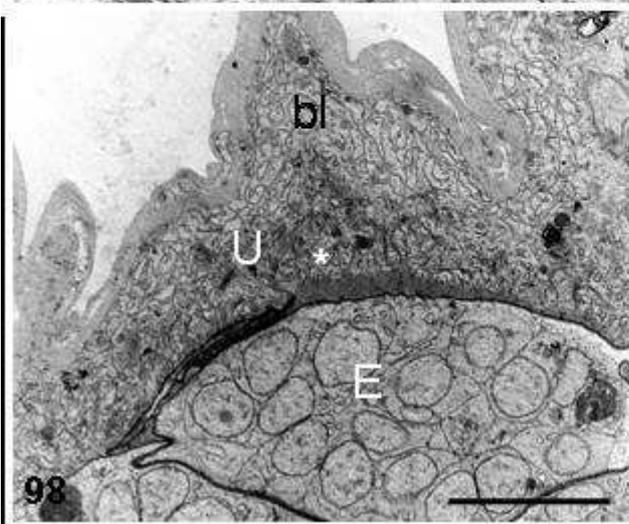
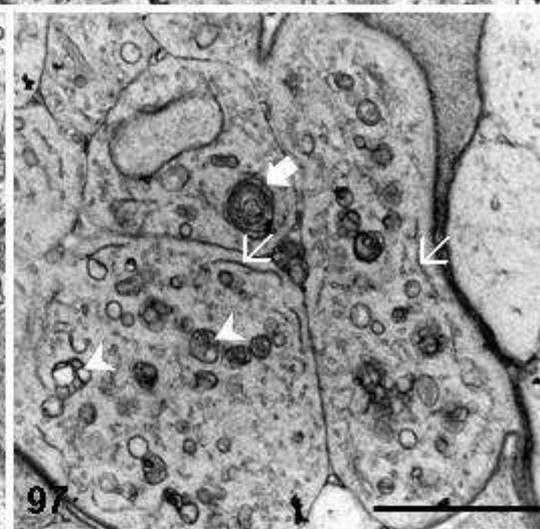
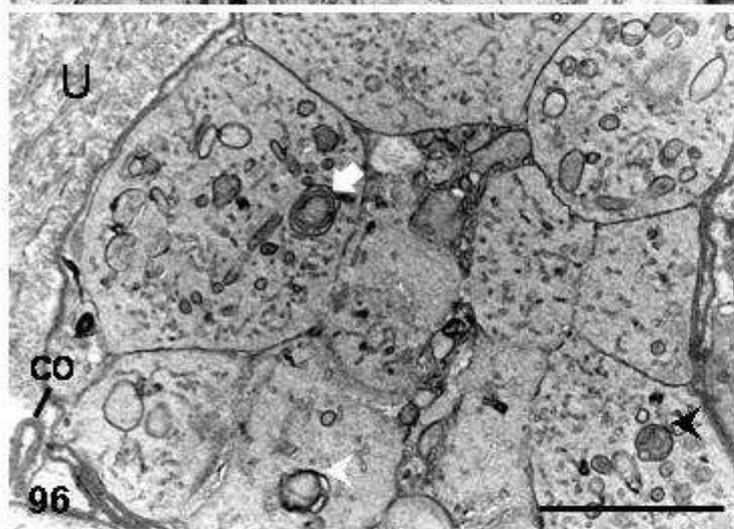
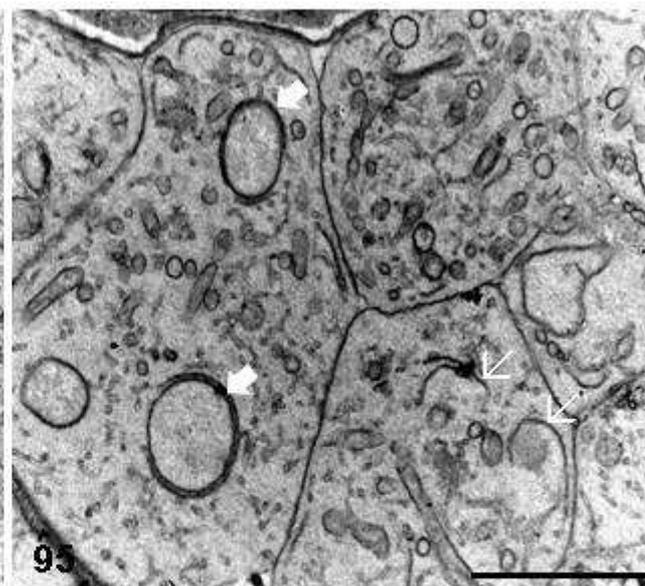
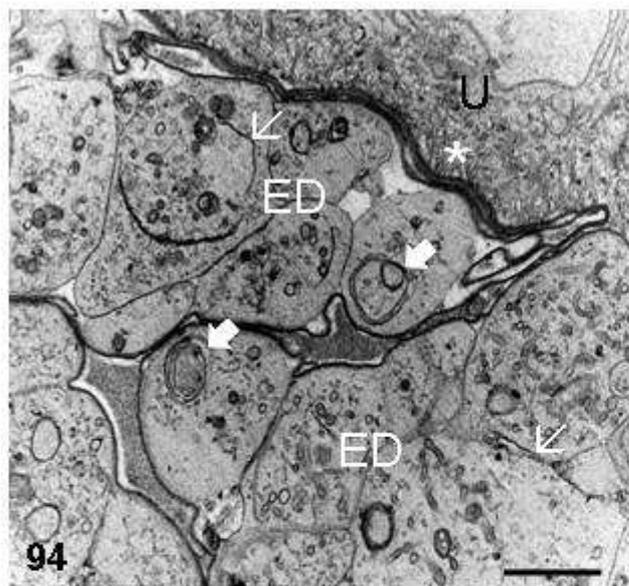


Figs 94-99. Microscopia eletrônica de transmissão do sistema reprodutivo das fêmeas de *L. chagasfilhoi* submetidas à ação de 12 mg/ kg de DEC.

Fig. 94. Embriões degenerados (ED) presentes no interior do útero (U) apresentando diversas figuras de mielina (seta larga) e retículo endoplasmático (seta fina). Na região do epitélio uterino que faz contato com o embrião há a presença de vesículas (asterisco). Barra 2 μm .

Figs. 95-97. Embriões em degeneração (ED) presentes no interior do útero apresentando figuras de mielina (seta larga), retículo endoplasmático (seta fina), e vacúolos (cabeça de seta). U, útero; CO, casca do ovo. Barra 2 μm .

Figs. 98-99. Útero apresentando um labirinto baso-lateral (bl) bastante evidente, e vesículas (asterisco) na região em contato com os embriões íntegros (E). Barras 5 μm e 2 μm , respectivamente.



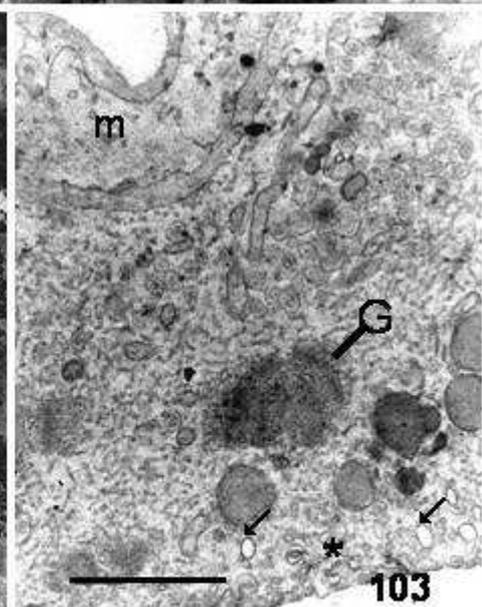
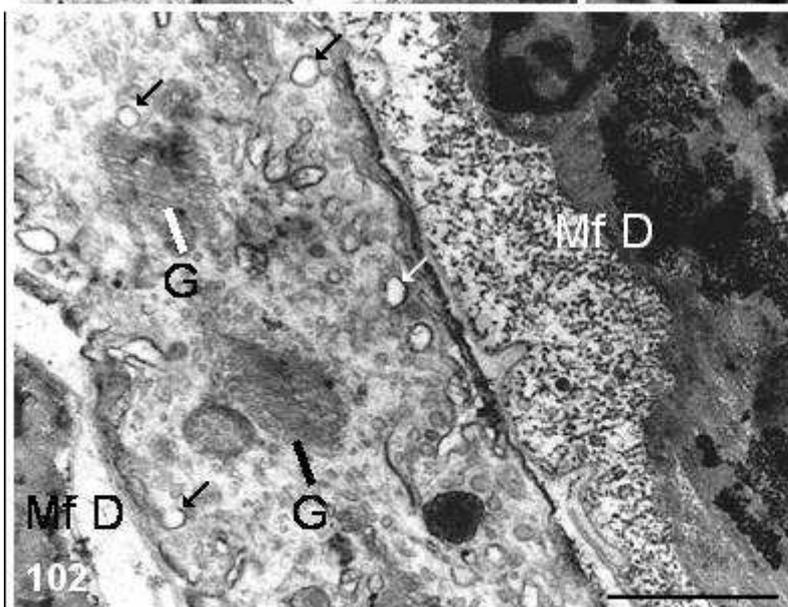
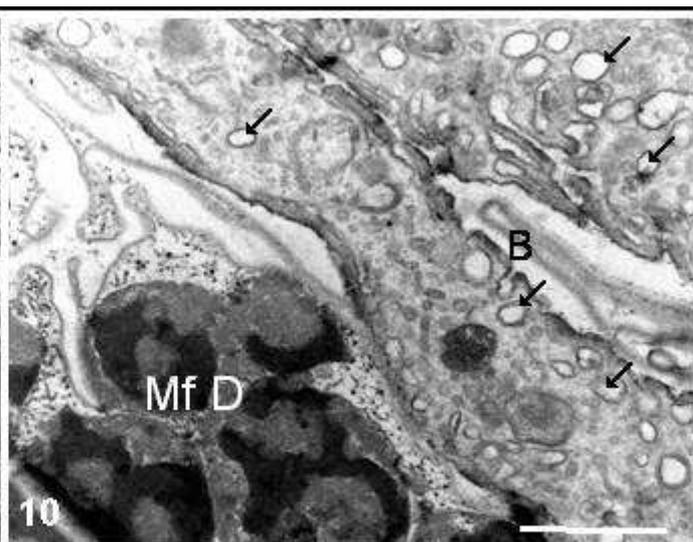
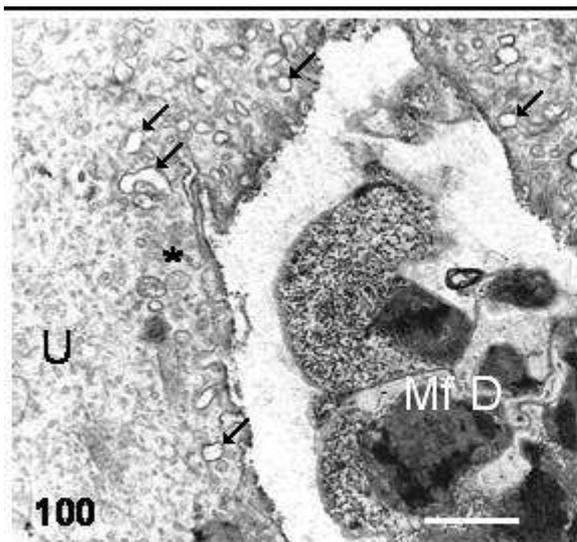
Figs 100-103. Microscopia eletrônica de transmissão do sistema reprodutivo das fêmeas de *L. chagasfilhoi* submetidas à ação de 12 mg/ kg de DEC.

Fig. 100. Microfilária degenerada (Mf D) no interior do útero (U), não apresentando bainha. A região do epitélio uterino que faz contato com a microfilária apresenta uma série de vesículas (seta fina). Barra 0,5 μm .

Fig. 101. Microfilária degenerada (Mf D) no interior do útero (U). A região do epitélio uterino que faz contato com a microfilária apresenta uma série de vesículas (seta fina). Foi possível observar a bainha de outra microfilária (B). Barra 1 μm .

Fig. 102. Microfilárias degeneradas (Mf D) no interior do útero. A região do epitélio uterino que faz contato com a microfilária apresenta uma série de vesículas (seta fina), além de complexo de Golgi (G). Barra 1 μm .

Fig. 103. Parede uterina com aspecto similar ao controle, apresentando uma camada muscular (m), complexo de Golgi (G) e uma grande quantidade de vesículas (seta fina). Barra 2 μm .

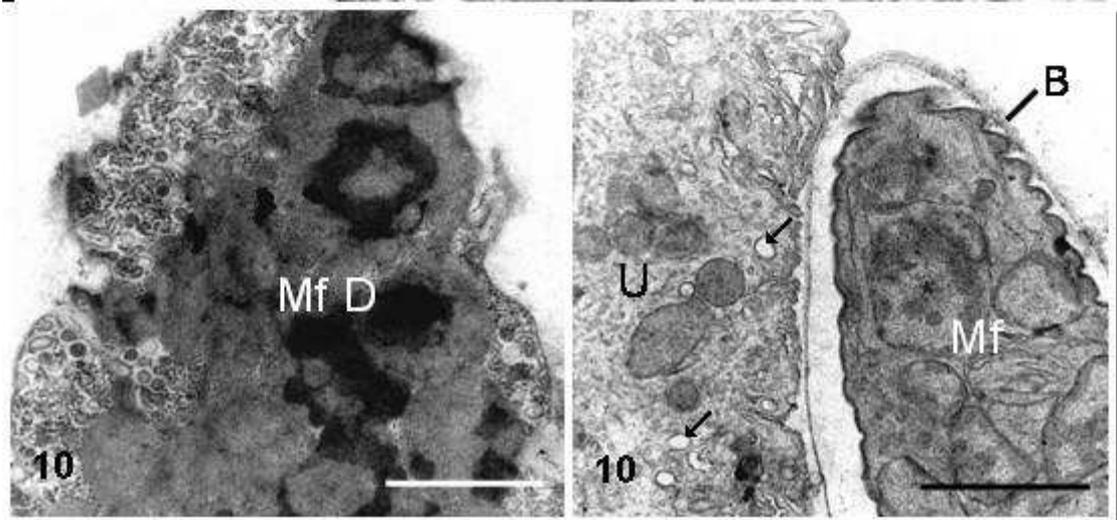
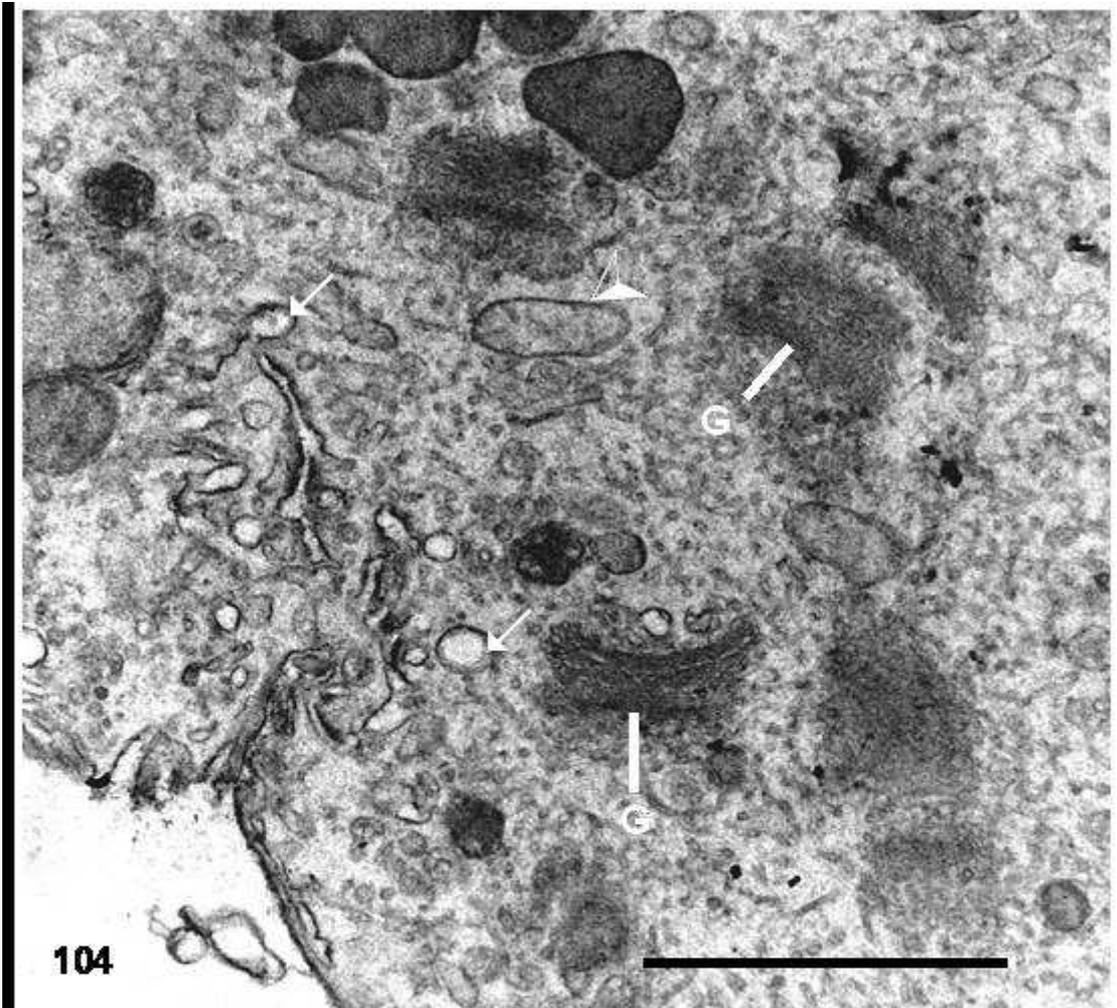


Figs 104-106. Microscopia eletrônica de transmissão do sistema reprodutivo das fêmeas de *L. chagasfilhoi* submetidas à ação de 12 mg/ kg de DEC.

Fig. 104. Detalhe do epitélio uterino apresentando perfis mitocondriais (cabeça de seta), complexo de Golgi (G) e uma grande quantidade de vesículas (seta fina). Barra 2 μ m.

Fig. 105. Detalhe de uma microfilária degenerada (Mf D), sendo formada por um conteúdo eletrondenso, não sendo possível distinguir nenhuma organela. A bainha não estava visível. Barra 2 μ m.

Fig. 106. Corte longitudinal de uma microfilária (Mf) que permaneceu com seu aspecto normal mesmo após o tratamento, apresentando uma bainha íntegra (B). Foi possível observar vesículas (seta fina) no epitélio uterino. Barra 2 μ m.



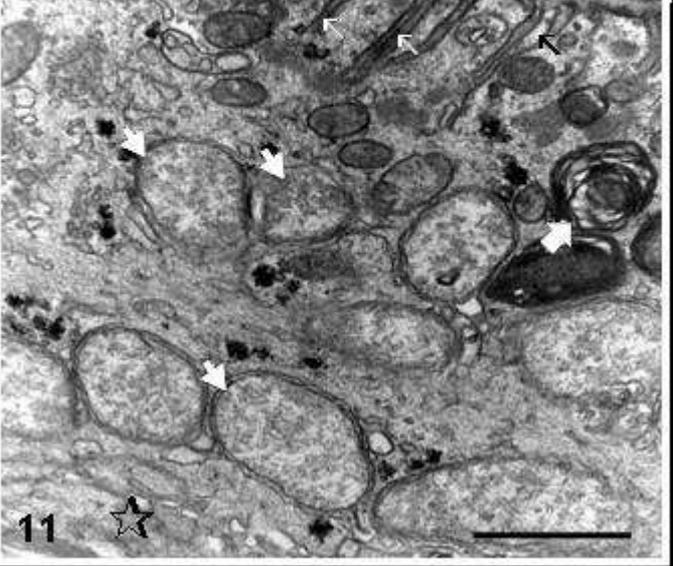
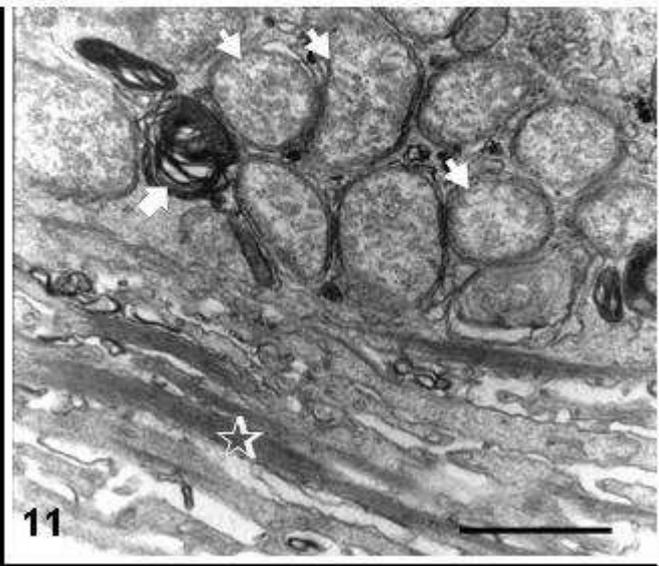
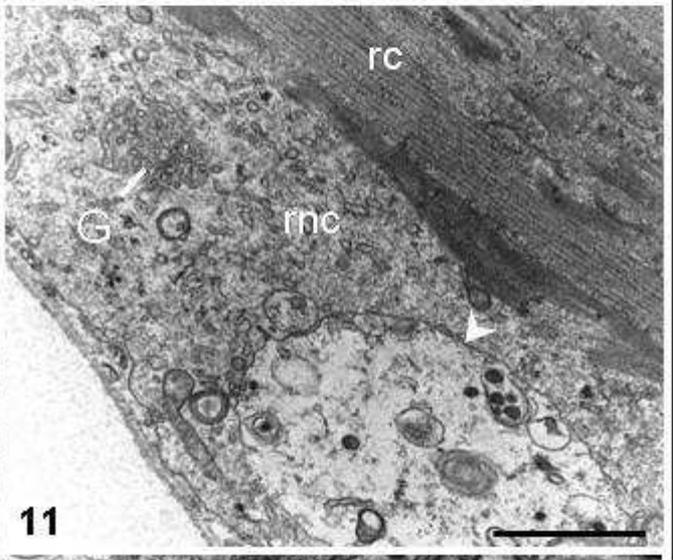
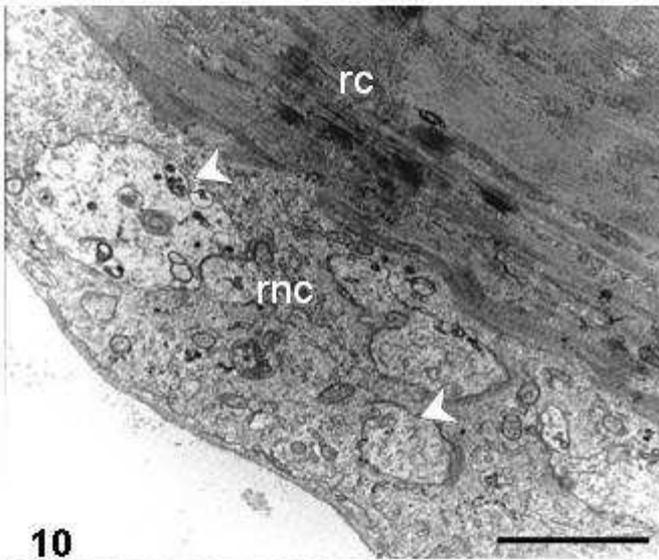
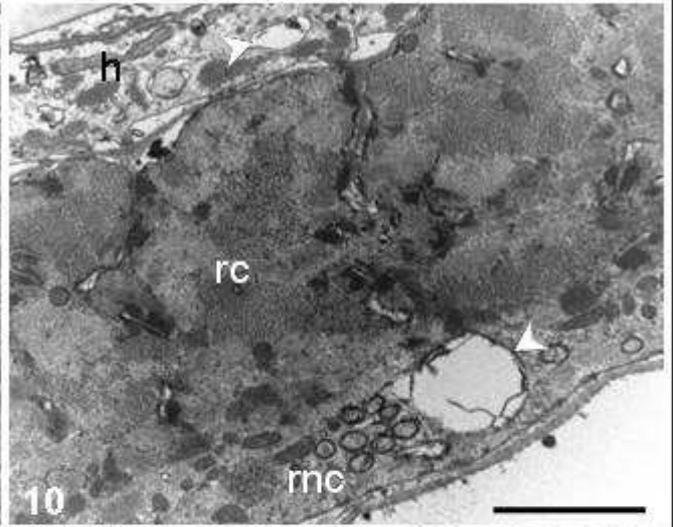
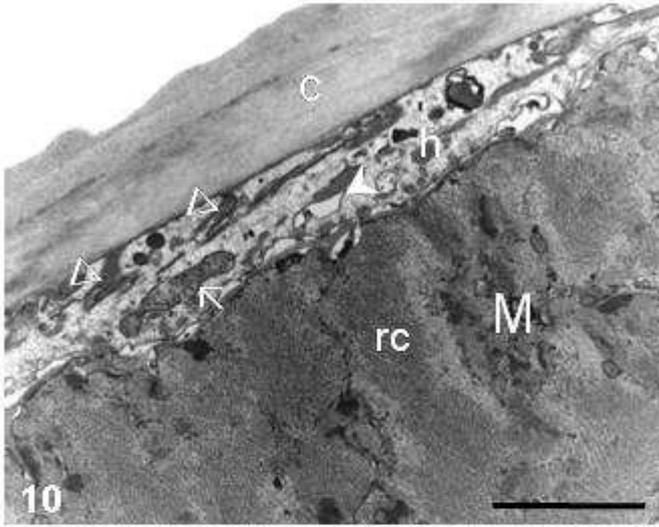
Figs. 107-112. Microscopia eletrônica de transmissão da parede do corpo das fêmeas de *L. chagasfilhoi* submetidas à ação de 6 mg/ kg de DEC co-administrados com 40 mg de albendazol.

Fig. 107. Corte transversal da cutícula (C), hipoderme (h) e região contrátil (rc) da camada muscular (M). Na hipoderme foram observadas além de membranas convolutas (cabeça de seta vazada) e de perfis mitocondriais (seta fina), diversos vacúolos (cabeça de seta). Barra 1 μm .

Fig. 108. Corte transversal da hipoderme (h) e das regiões contrátil e não-contrátil da camada muscular. A hipoderme e a região não contrátil da musculatura apresentam vacúolos (cabeça de seta), enquanto a região contrátil não demonstrou nenhuma alteração. rc, região contrátil da fibra muscular; rnc, região não-contrátil da fibra muscular. Barra 1 μm .

Fig. 109 e 110. Corte longitudinal da camada muscular demonstrando a formação de diversos vacúolos (cabeça de seta) na região não contrátil (rnc) da fibra. A região contrátil (rc) não apresentou nenhuma alteração. G, complexo de Golgi. Barra 1 μm .

Fig. 111 e 112. Detalhe do cordão hipodermal demonstrando a presença de uma colônia de bactérias em seu interior (seta). Em meio à colônia de bactérias foram observadas figuras de mielina eletrondensas (seta larga). Foi possível observar o aspecto esponjoso da região do cordão hipodermal próxima ao pseudoceloma (estrela). Seta fina, membranas convolutas. Barra 1 μm .

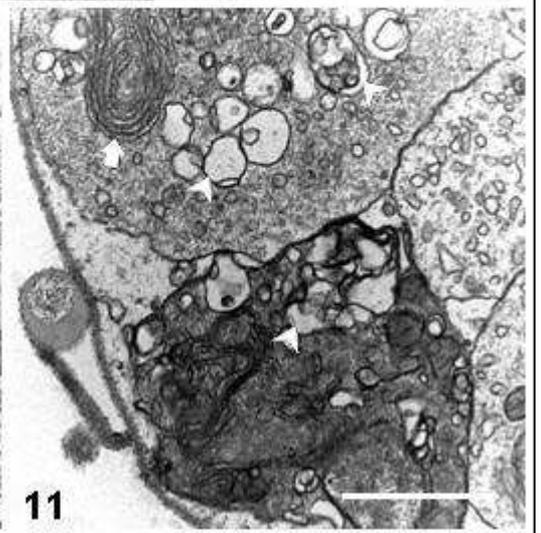
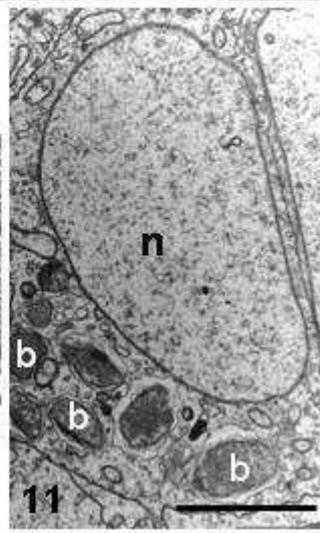
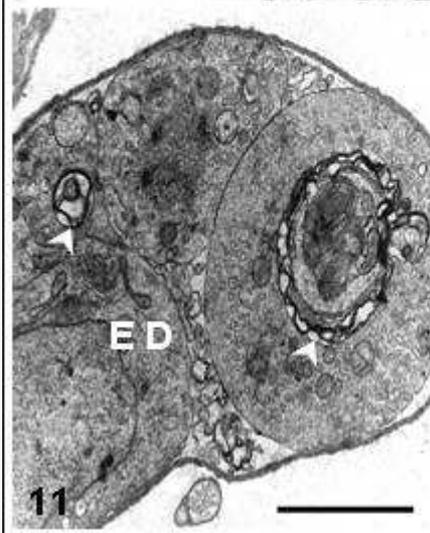
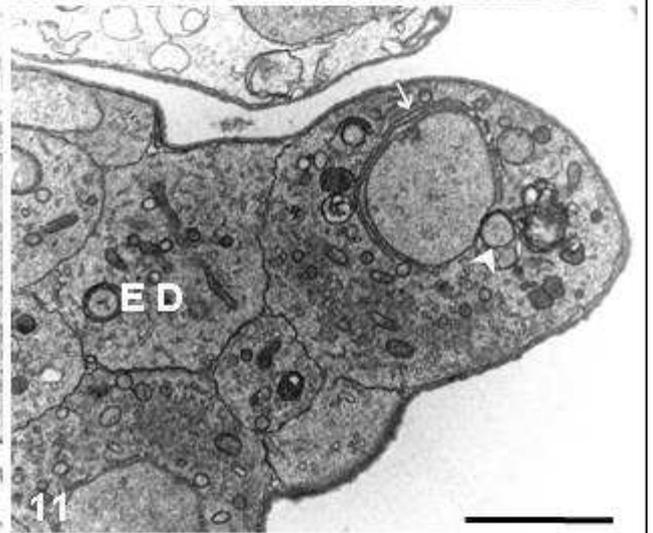
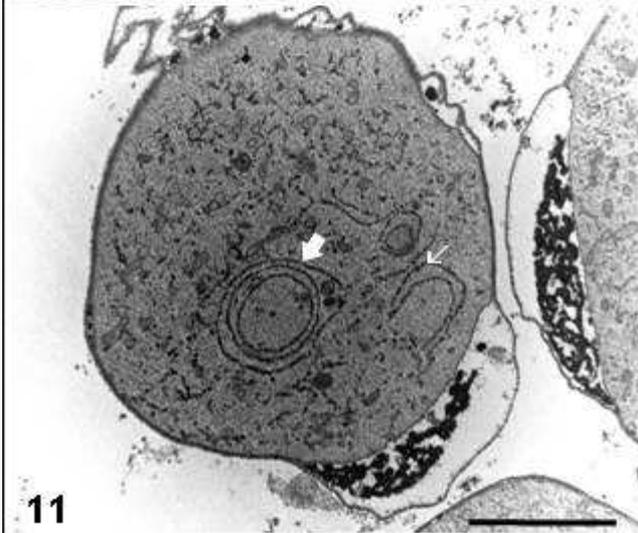
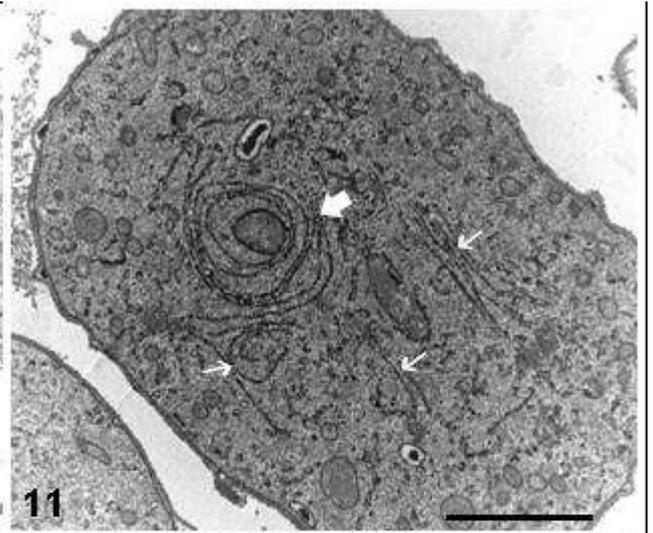
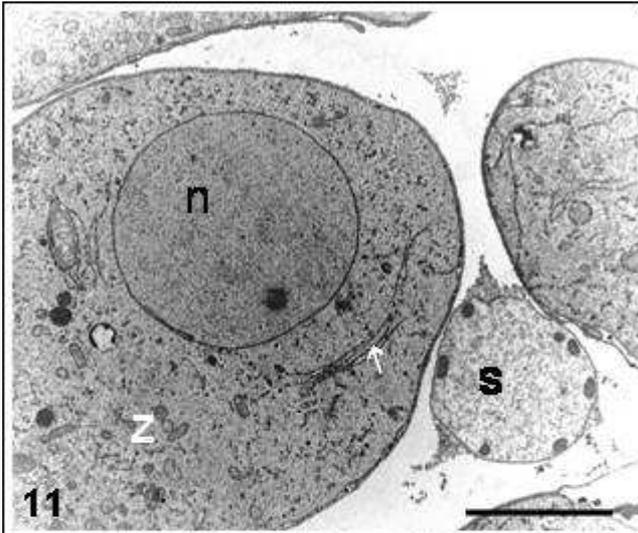


Figs. 113-119. Microscopia eletrônica de transmissão das fêmeas de *L. chagasfilhoi* submetidas à ação de 6 mg/ kg de DEC co-administrados com 40 mg de albendazol.

Fig. 113. Zigoto de aspecto inalterado apresentando núcleo com nucléolo (n), e retículo endoplasmático (seta fina) em seu citoplasma. S, espermatozóide. Barra 1 μm .

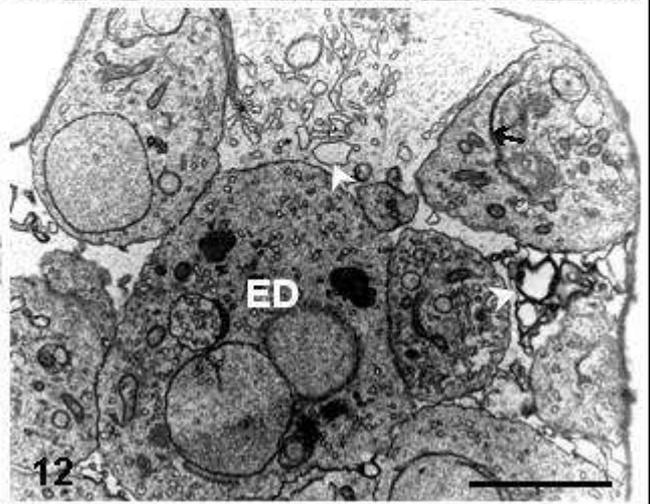
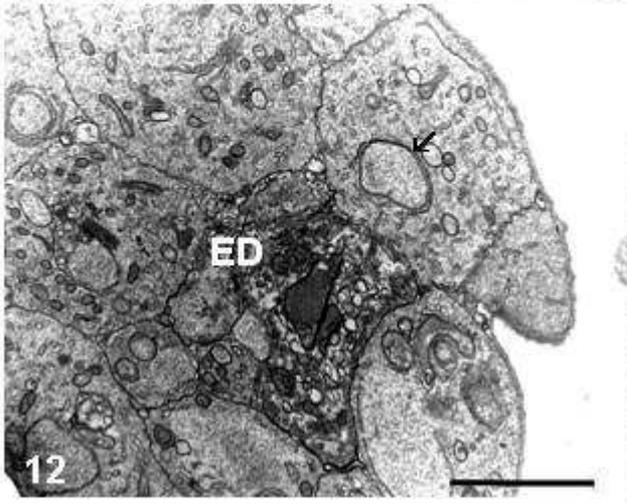
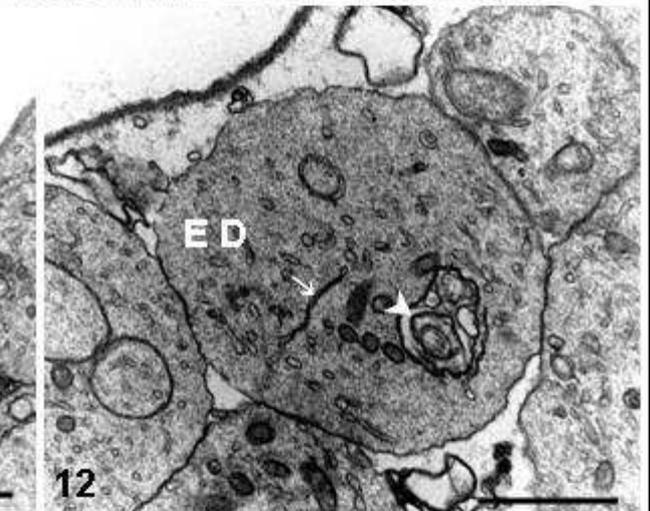
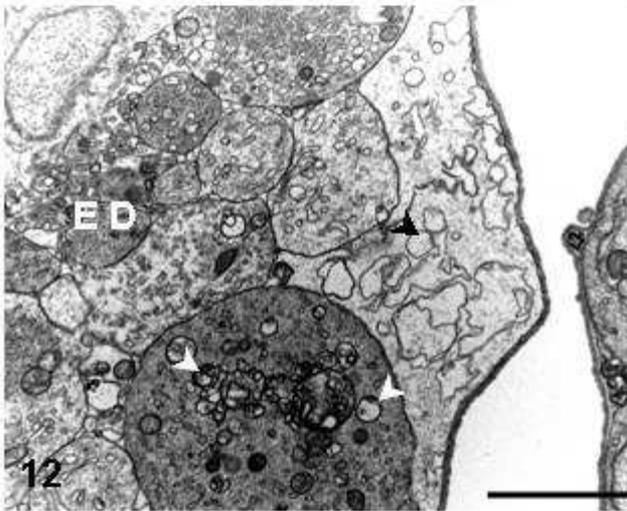
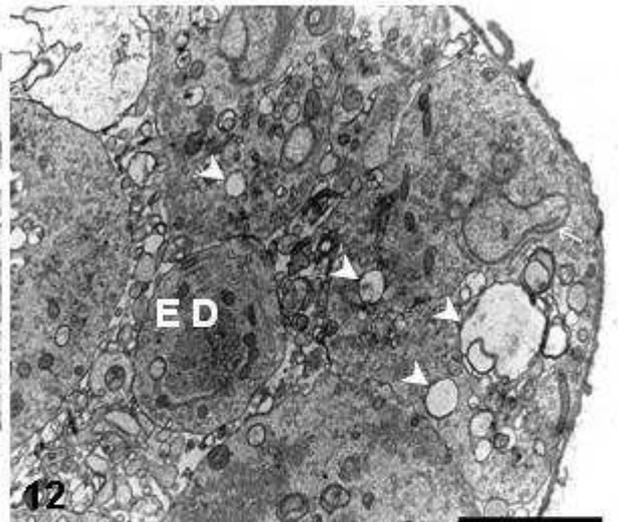
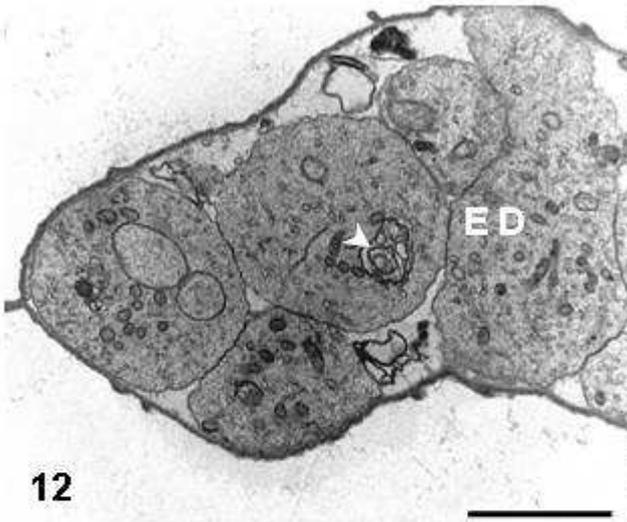
Fig. 114 e 115. Zigoto apresentando retículo endoplasmático (seta fina) e figuras de mielina sendo formadas em seu citoplasma (seta larga) sugerindo uma conseqüência da ação das drogas. Barra 1 μm .

Fig. 116-119. Embriões alterados pela ação das drogas (ED) apresentando diversos vacúolos (cabeça de seta), retículo endoplasmático envolvendo o núcleo, indicando o início de um processo degenerativo. Figuras de mielina também foram observadas (seta larga) e a maioria das organelas estava indistinguível havendo uma desorganização celular. Bactérias foram observadas no citoplasma de alguns embriões (b). Barra 1 μm .



Figs. 120-125. Microscopia eletrônica de transmissão das fêmeas de *L. chagasfilhoi* submetidas à ação de 6 mg/ kg de DEC co-administrados com 40 mg de albendazol.

Figs. 120-125. Embriões degenerados (ED) apresentando diversos vacúolos (cabeça de seta), e completa desorganização celular. Seta fina, retículo endoplasmático. Barra 1 μm .



Figs 126-130. Microscopia eletrônica de transmissão das fêmeas de *L. chagasfilhoi* submetidas à ação de 6 mg/ kg de DEC co-administrados com 40 mg de albendazol.

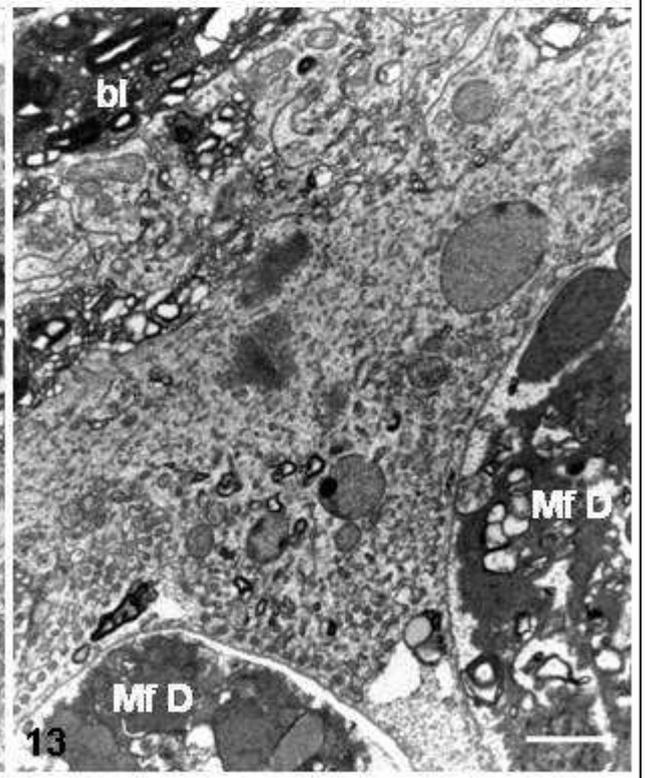
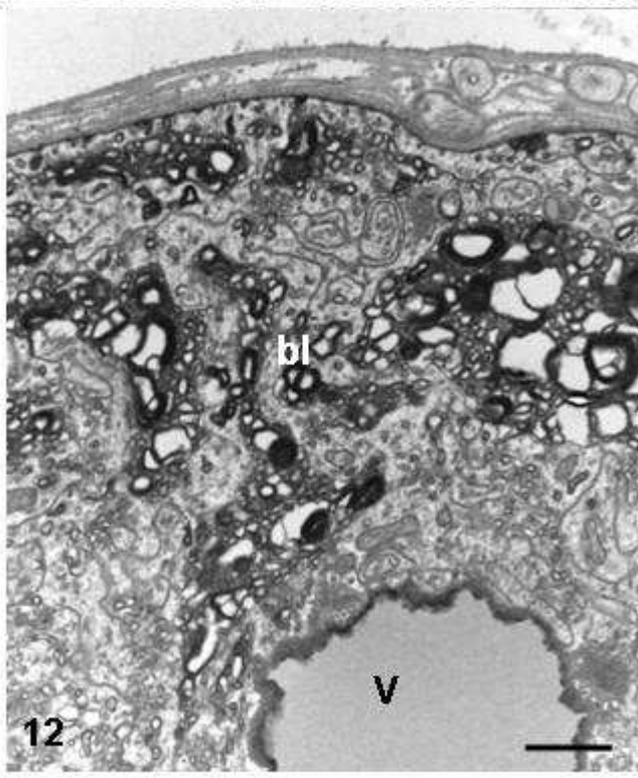
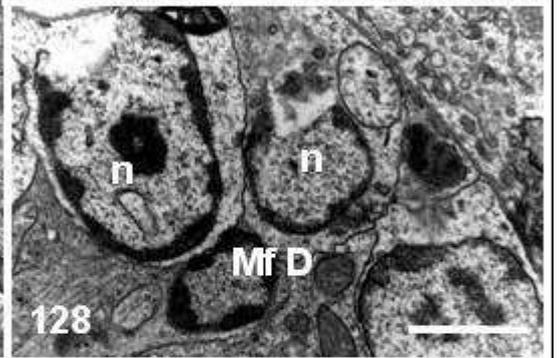
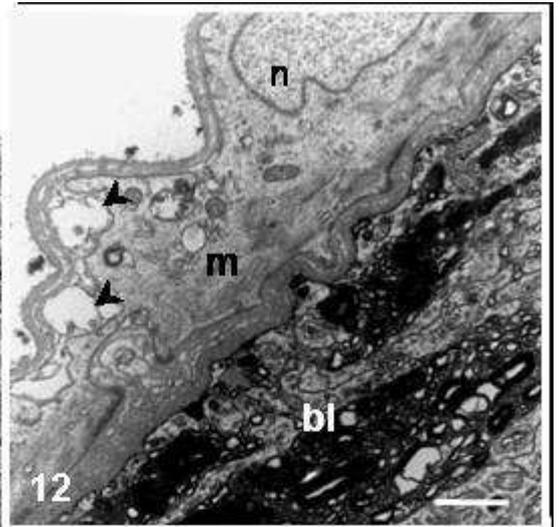
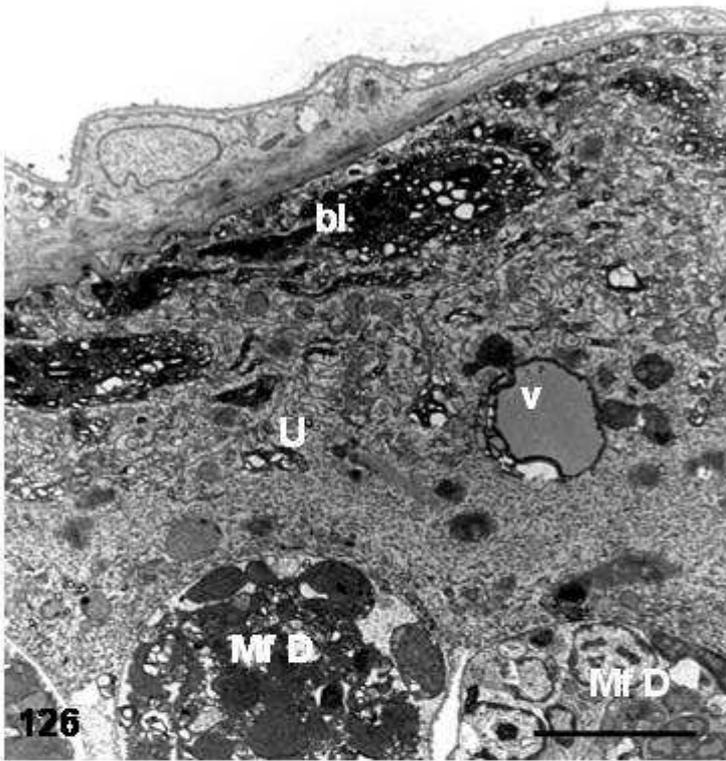
Fig. 126. Microfilárias (Mf D) completamente degeneradas presentes no interior do útero (U). A parede uterina (U) possui uma maior quantidade de invaginações de membrana no labirinto baso-lateral (bl), apresentando um aspecto bastante eletrondenso. No epitélio uterino há também a presença de uma vesícula (V). Barra 0,2 µm.

Fig. 127. Detalhe da camada muscular (m) presente na parede uterina apresentando vesículas (cabeça de seta) na região não contrátil. N, núcleo; bl, labirinto baso-lateral. Barra 0,5 µm.

Fig. 128. Detalhe de uma microfilária em degeneração apresentando um núcleo (n) com a membrana plasmática rompida. Barra 1 µm.

Fig. 129. Detalhe do epitélio uterino demonstrando o aumentado labirinto baso-lateral (bl), que se apresenta bastante eletrondenso, havendo a formação de vacúolos nesta região (cabeça de seta). V, vesícula. Barra 0,5 µm.

Fig. 130. Microfilárias degeneradas (Mf D) com citoplasma desorganizado, bastante eletrondenso, em contato com o epitélio uterino. Bl, labirinto baso-lateral. Barra 0,5 µm.



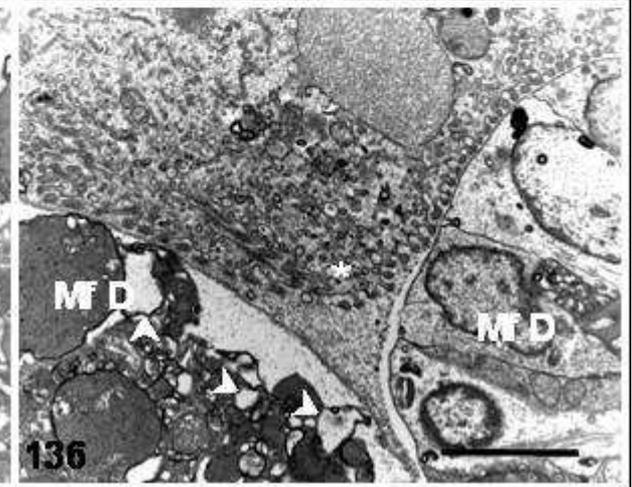
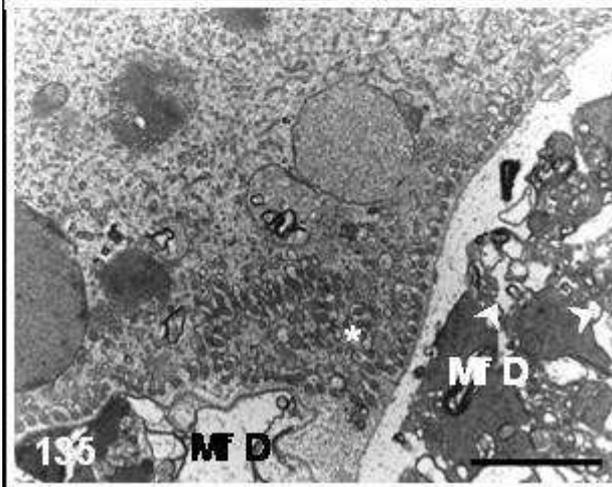
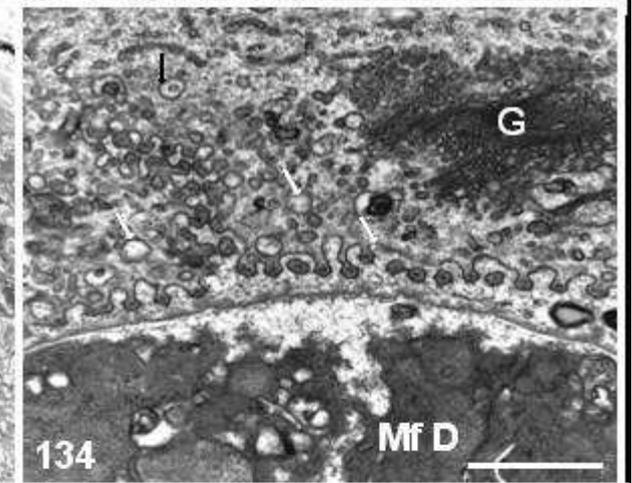
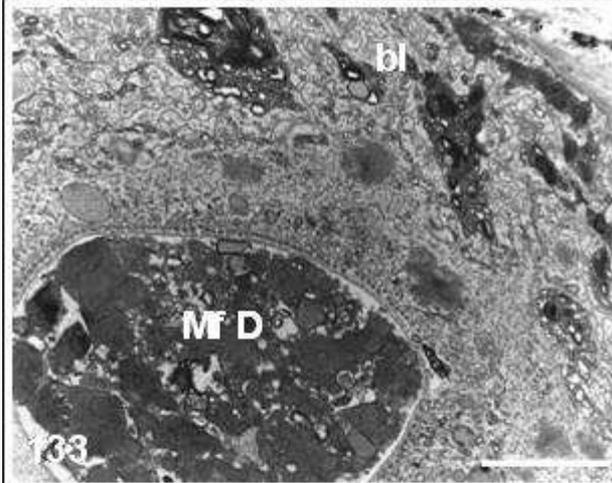
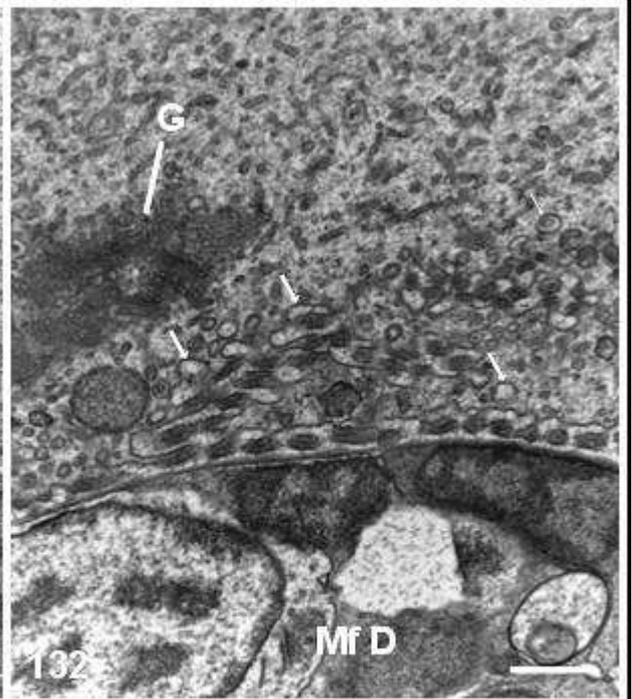
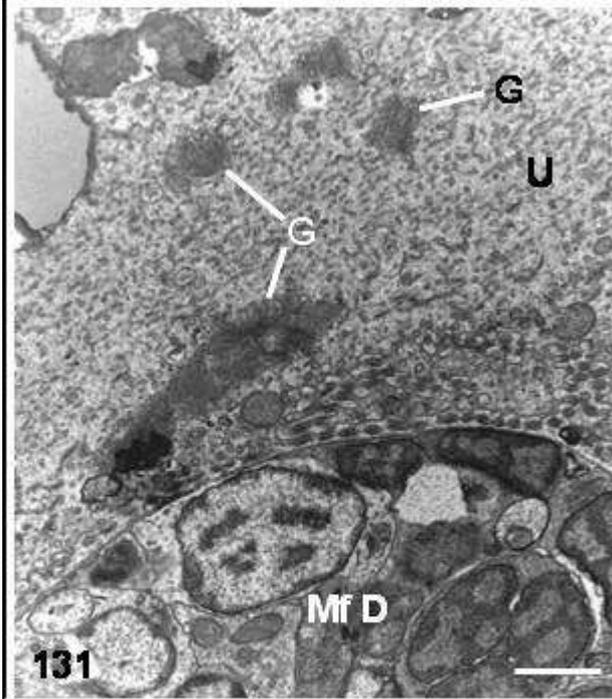
Figs 131-136. Microscopia eletrônica de transmissão das fêmeas de *L. chagasfilhoi* submetidas à ação de 6 mg/ kg de DEC co-administrados com 40 mg de albendazol.

Fig. 131-132. Microfilária em degeneração (Mf D) em contato com o epitélio uterino (U). A região em que o epitélio uterino faz contato com o embrião há a presença de uma série de vesículas (seta fina). Diversos complexos de Golgi foram observados (G). Barra 0,5 μm .

Fig. 133. Microfilária completamente degenerada (Mf D) apresentando um citoplasma eletrondenso com completa desorganização celular. No epitélio uterino foi possível observar o aumentado labirinto baso-lateral, com regiões eletrondenadas (bl). Barra 1 μm .

Fig. 134. Detalhe da região de contato da microfilária degenerada (Mf D) com a parede uterina mostrando a grande quantidade de vesículas nesta área (seta fina). G, complexo de Golgi. Barra 1 μm .

Figs 135 e 136. Microfilárias degeneradas (Mf D) apresentando uma série de vacúolos em seu interior (cabeça de seta). Na região em que a microfilária faz contato com o epitélio uterino há a presença de muitas vesículas (asterisco). Barra 1 μm .



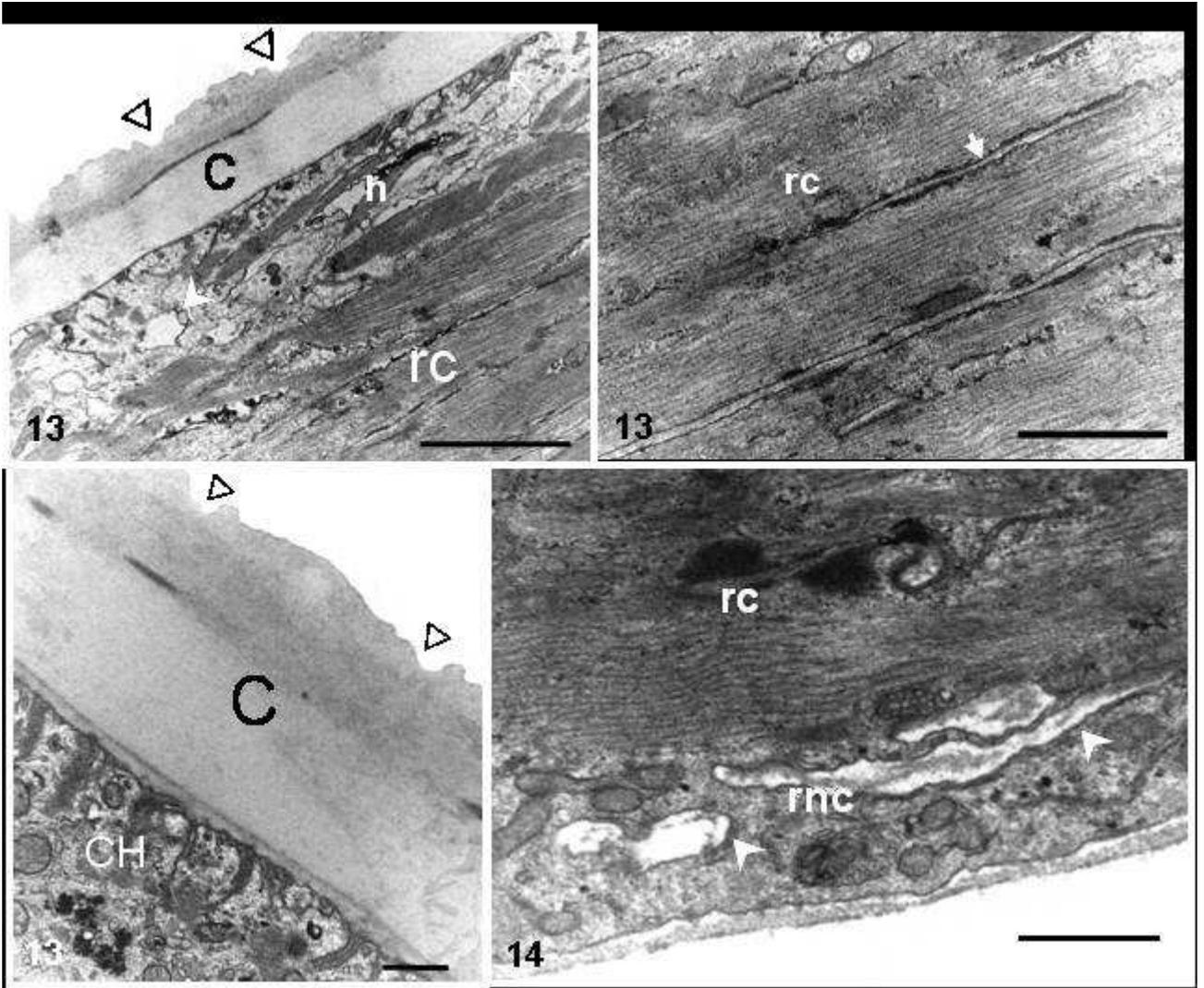
Figs. 137-140. Microscopia eletrônica de transmissão das fêmeas de *L. chagasfilhoi* submetidas à ação de 12 mg/ kg de DEC co-administrados com 80 mg de albendazol.

Fig. 137. Corte longitudinal demonstrando a cutícula (C), hipoderme (h), e região contrátil da camada muscular (rc). Na hipoderme foram observados vacúolos (cabeça de seta). Foi possível observar as estriações cuticulares (cabeça de seta vazada). Barra 1 μm

Fig. 138. Corte longitudinal da região contrátil (rc) da camada muscular demonstrando as miofibrilas íntegras, organizadas entre os corpos densos (seta), sem nenhuma alteração. Barra 1 μm

Fig. 139. Corte longitudinal na altura do cordão hipodermal (CH) demonstrando a cutícula íntegra (C), sendo possível observar as estriações cuticulares transversais (cabeça de seta vazada). Barra 0,5 μm

Fig. 140. Corte longitudinal da fibra muscular formada por uma região contrátil (rc), rica em miofibrilas, e por uma região não-contrátil (rnc) onde foram observados vacúolos (cabeça de seta). Barra 0,5 μm

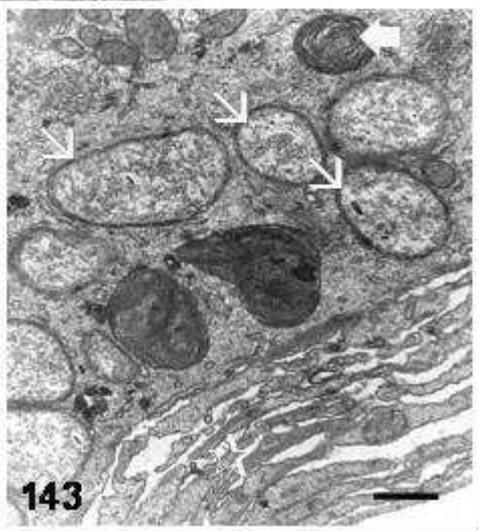
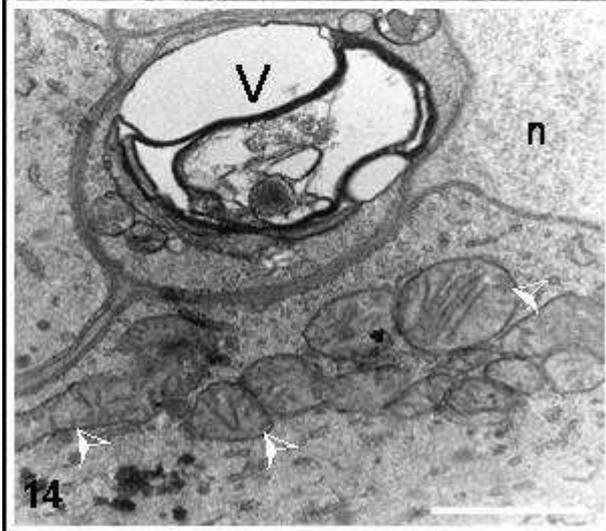
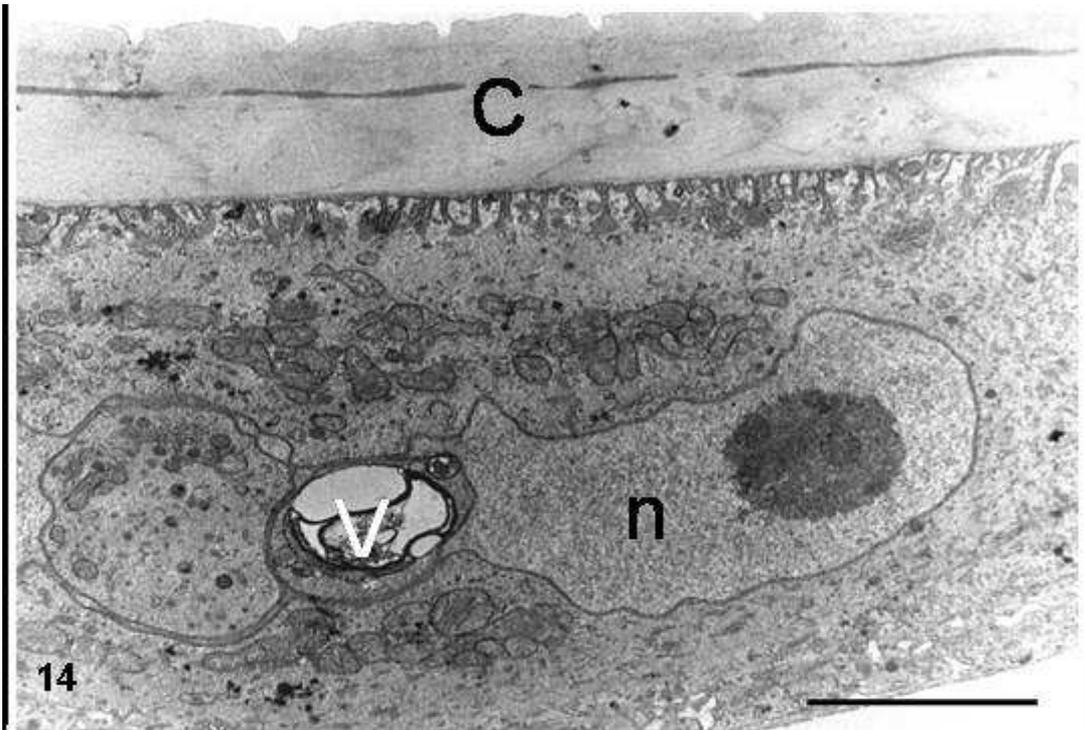


Figs. 141-143: Microscopia eletrônica de transmissão do cordão hipodermal das fêmeas de *L. chagasfilhoi* submetidas à ação de 12 mg/ kg de DEC co-administrados com 80 mg de albendazol.

Fig. 141. Corte longitudinal do cordão hipodermal demonstrando a presença de um vacúolo (V) formado no interior do núcleo (n). C, cutícula. Barra 1 μm

Fig. 142. Detalhe do cordão hipodermal apresentando um vacúolo (V) no interior do núcleo (n). Uma grande quantidade de perfis mitocondriais foi observada nesta região (cabeça de seta). c, cutícula. Barra 1 μm

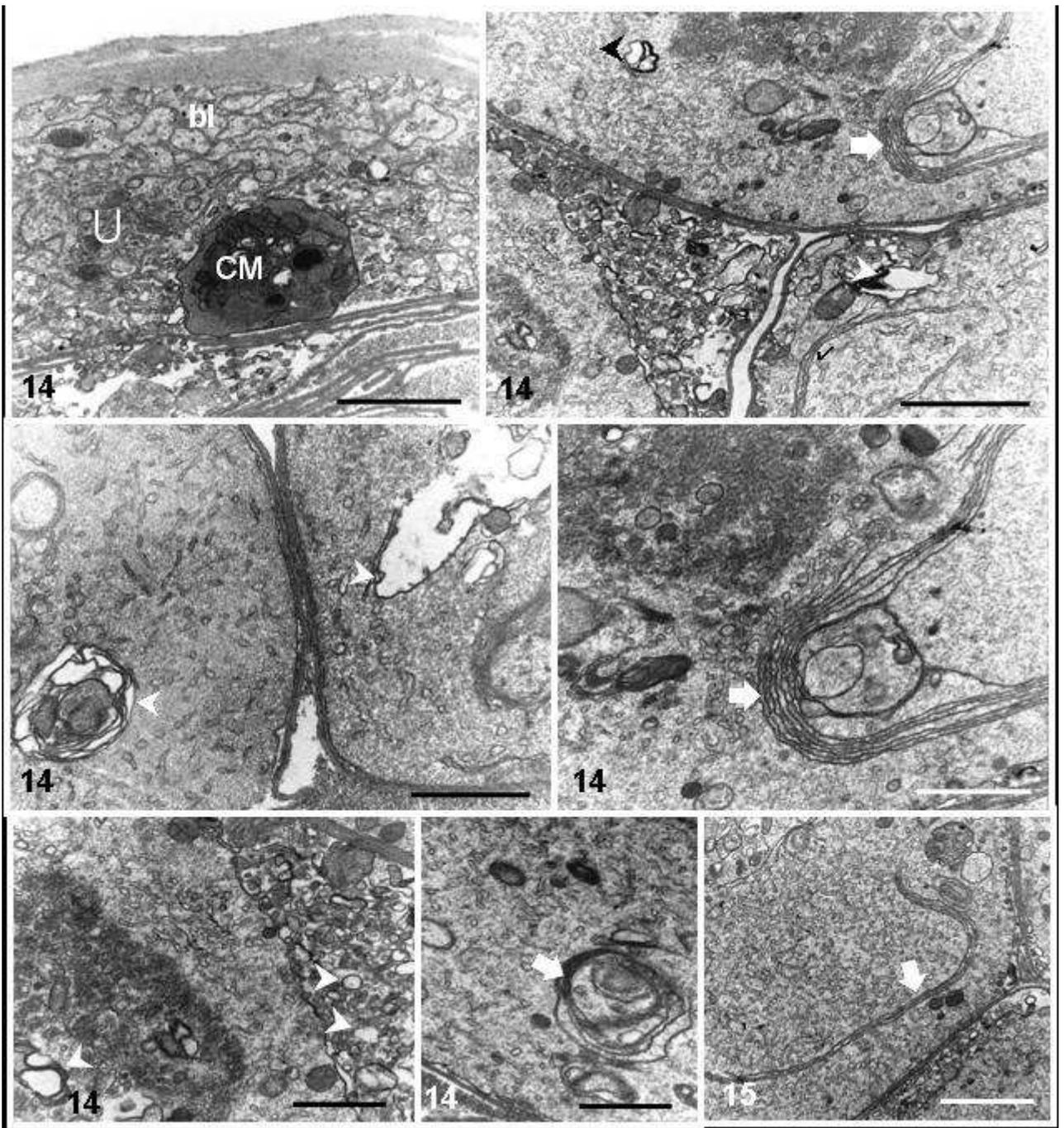
Fig. 143. Detalhe do cordão hipodermal apresentando uma colônia de bactérias (seta fina). Uma figura de mielina eletrondensa foi observada (seta larga). A região esponjosa do cordão hipodermal também foi visualizada (estrela). Barra 0,5 μm



Figs. 144-150. Microscopia eletrônica de transmissão do cordão hipodermal das fêmeas de *L. chagasfilhoi* submetidas à ação de 12 mg/ kg de DEC co-administrados com 80 mg de albendazol.

FIG. 144. Parede uterina apresentando um corpo multivesicular (cm) bastante eletrondenso na região do epitélio uterino próxima ao lúmen. Barra 1 μ m

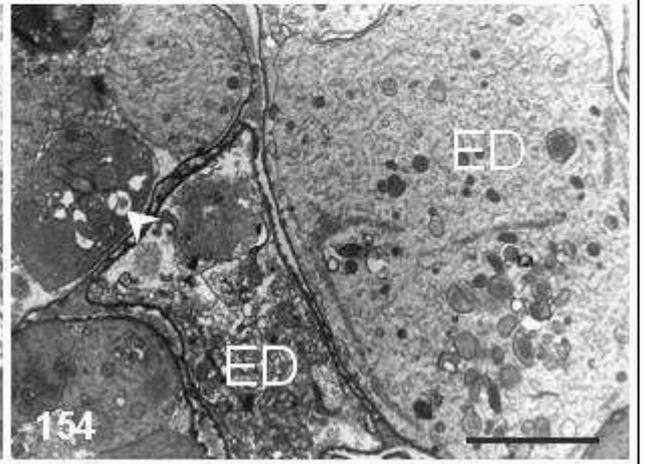
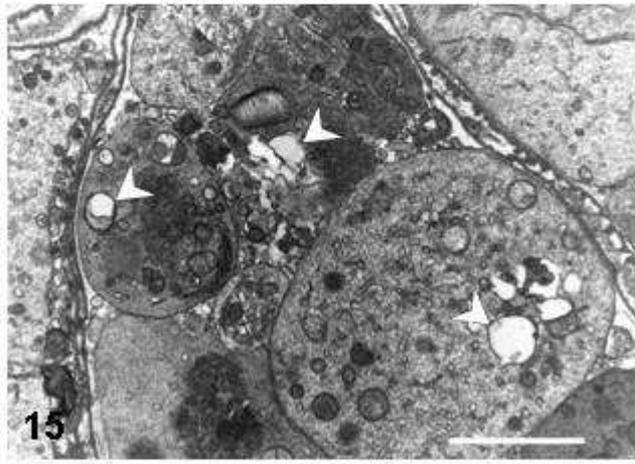
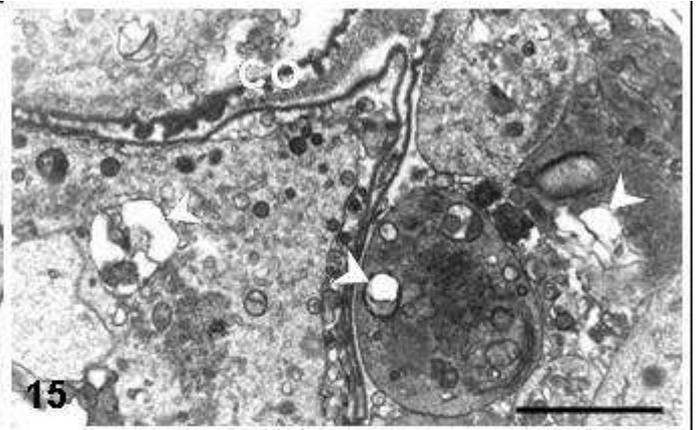
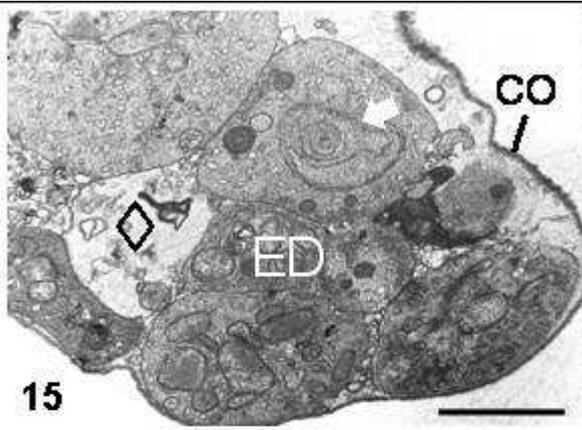
Fig. 145-150. Detalhe de zigotos apresentando desorganização celular, possuindo vacúolos (cabeça de seta) e figuras de mielina (seta larga). Barra 1 μ m



Figs. 151-154. Microscopia eletrônica de transmissão de embriões de *L. chagasfilhoi* submetidas à ação de 12 mg/ kg de DEC co-administrados com 80 mg de albendazol.

Fig. 151. Embrião degenerado (ED) apresentando completa desorganização celular, sendo possível observar figuras de mielina (seta larga) e regiões com aspecto vazio (losango). CO, casca do ovo. Barra 1 μ m

Fig. 152- 154. Detalhe de embriões degenerados (ED) apresentando diversos vacúolos (cabeça de seta) e regiões com diferentes padrões de eletrondensidade, não sendo possível observar nenhuma organela. A casca do ovo (CO) apresenta uma morfologia alterada, possuindo um aspecto enrugado. Barra 1 μ m

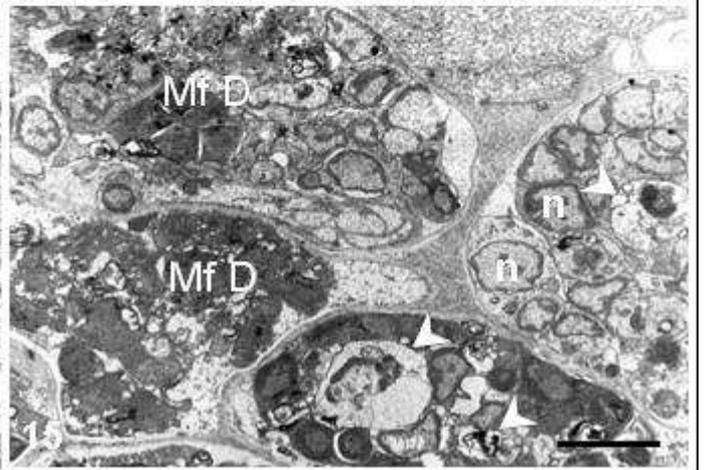
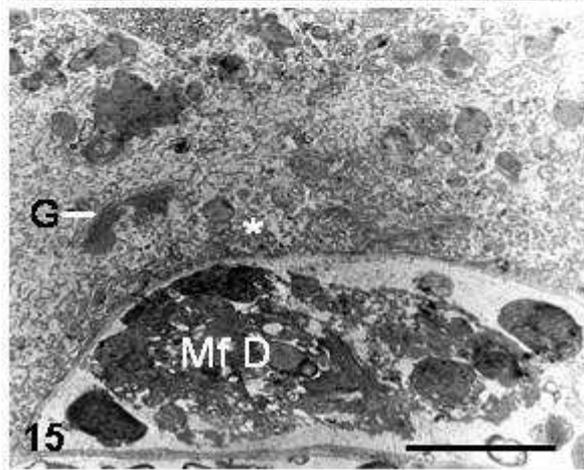
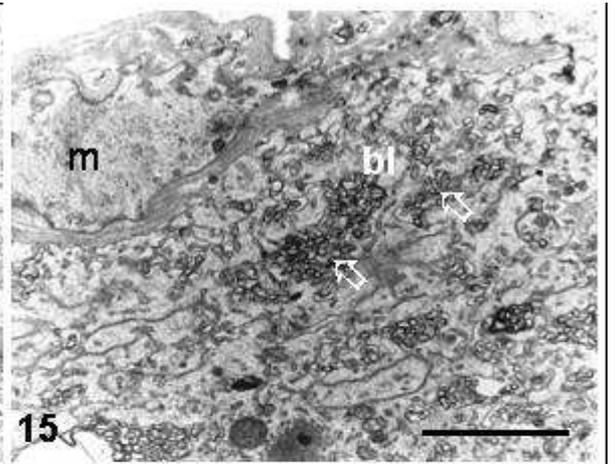
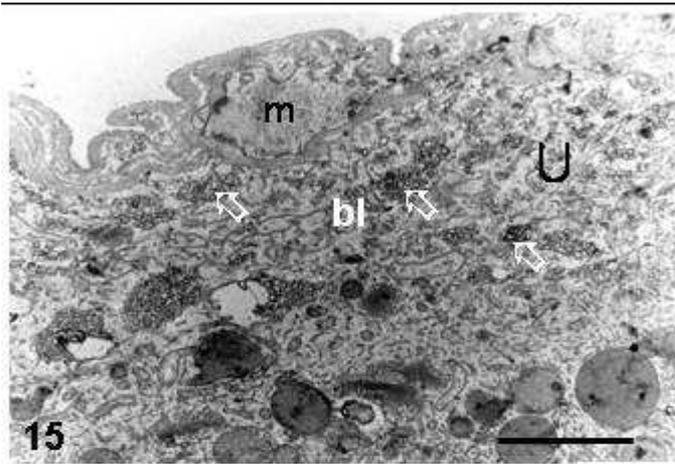


Figs. 155-158. Microscopia eletrônica de transmissão das fêmeas de *L. chagasfilhoi* submetidas à ação de 12 mg/ kg de DEC co-administrados com 80 mg de albendazol.

Fig. 155 e 156. Útero apresentando um labirinto baso-lateral aumentado (bl), havendo uma maior concentração de invaginações de membrana em algumas regiões (seta larga vazada) e a formação de vacúolos (cabeça de seta). m, camada muscular da parede uterina. Barra 1 μ m

Fig. 157. Microfilária completamente degenerada (Mf D) apresentando um citoplasma eletrondenso com completa desorganização celular. Na região de contato entre a microfilária e o epitélio uterino há a presença de diversas vesículas (asterisco). G, complexo de Golgi. Barra 1 μ m

Fig. 158. Microfilárias presentes no interior do útero apresentando diferentes níveis de degeneração (Mf D). Em algumas microfilárias núcleos (n) e diversos vacúolos (cabeça de seta) foram observados, enquanto outros apresentavam um citoplasma eletrondenso com completa desorganização celular. Barra 1 μ m



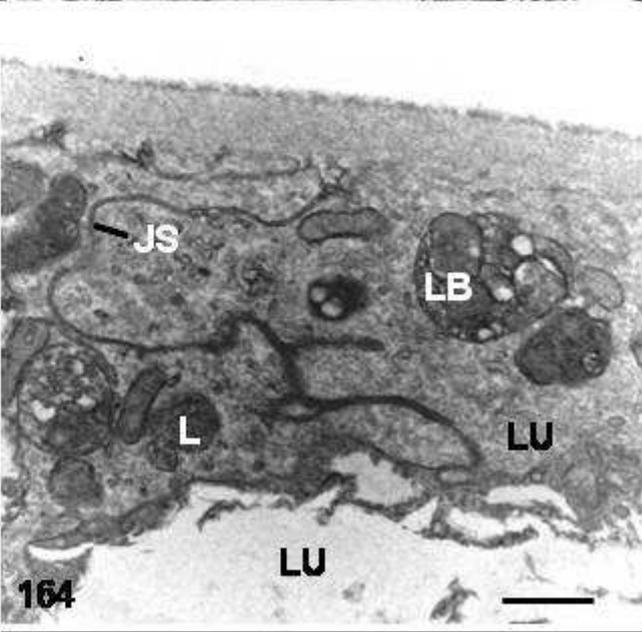
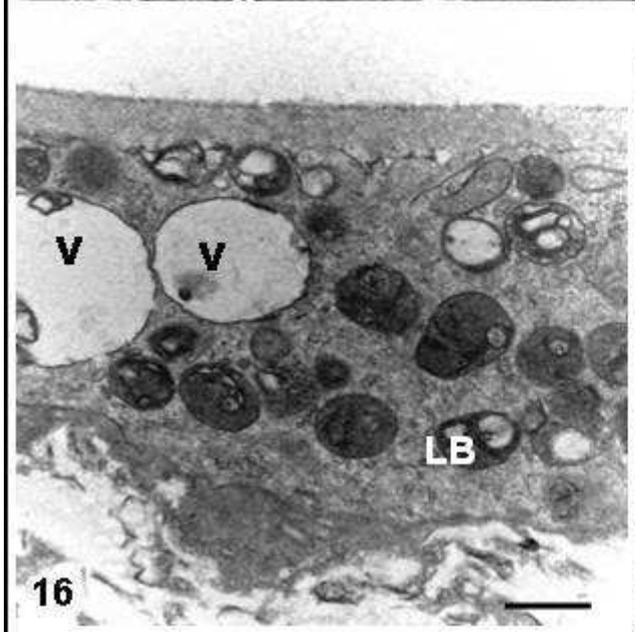
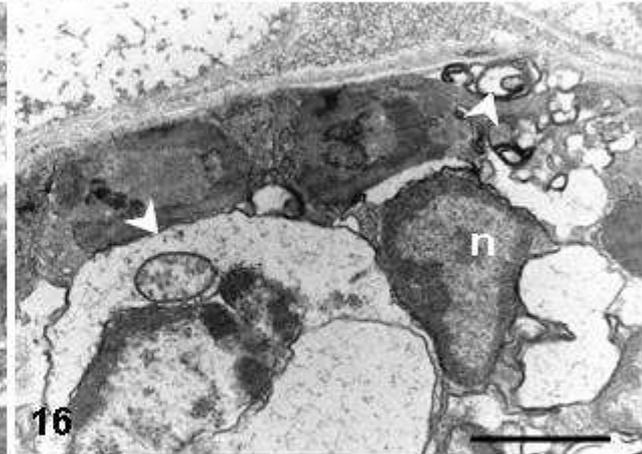
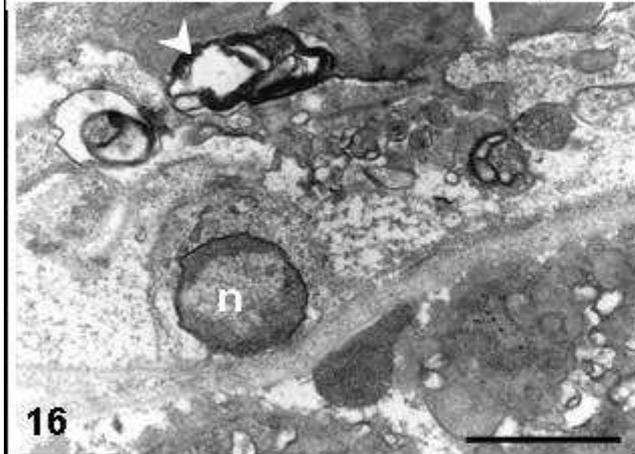
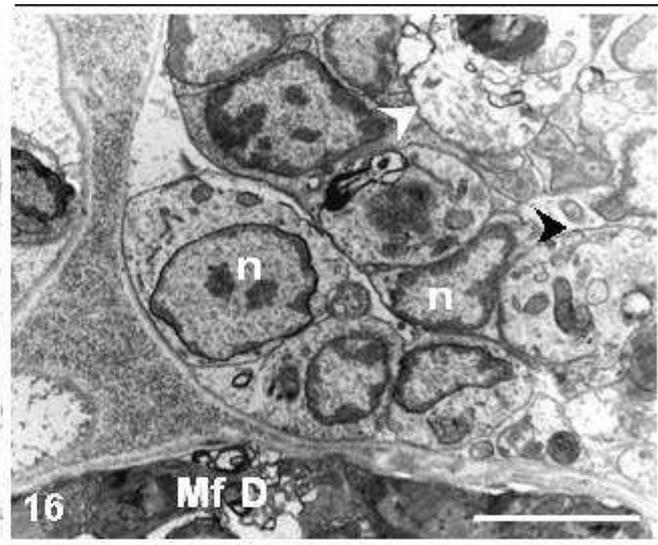
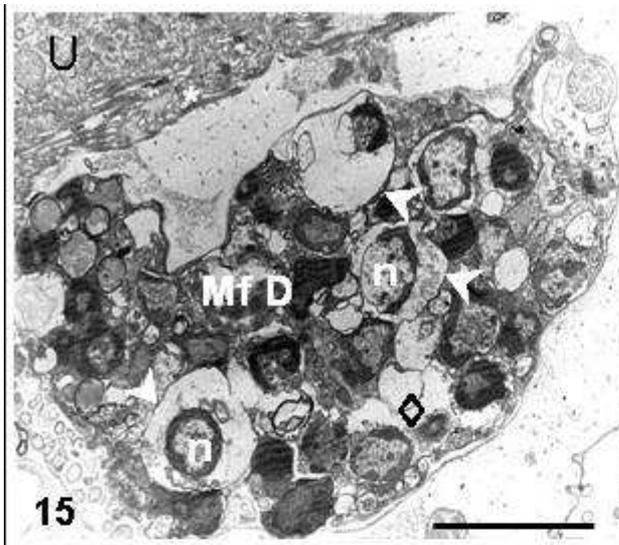
Figs 159-164. Microscopia eletrônica de transmissão das fêmeas de *L. chagasfilhoi* submetidas à ação de 12 mg/ kg de DEC co-administrados com 80 mg de albendazol.

Fig. 159. Microfilária em degeneração (Mf D) presentes no interior do útero (U) apresentando vacúolos (cabeça de seta) e regiões com aspecto vazio (losango). Alguns núcleos (n) ainda estavam visíveis. Barra 1 μ m

Fig. 160. Microfilária em degeneração (Mf D) apresentando diversos vacúolos (cabeça de seta). Alguns núcleos (n) ainda estavam visíveis. Barra 1 μ m

Figs 161-162. Detalhe das microfilárias apresentando diversos vacúolos (cabeça de seta), indicando um processo degenerativo. Alguns núcleos (n) ainda estavam visíveis. Barra 1 μ m

Figs 163-164. Parede intestinal apresentando junções septadas (JS) entre as células intestinais. No interior de cada célula intestinal há a presença de vacúolos (V), inclusões lipídicas (L) e corpos lisossomais (LB). LU, lúmen. Barra 0,5 μ m.



5. DISCUSSÃO

O conhecimento do sistema reprodutor da fêmea é muito importante para uma melhor compreensão da biologia do nematóide e para avaliar o efeito de drogas; contudo, poucos estudos têm sido feitos neste assunto. Embora alguns estudos ultraestruturais com *Litomosoides chagasfilhoi* tenham sido feitos (Moraes-Neto *et al.*, 2001, 2003, 2006), esta é a primeira descrição detalhada do sistema reprodutor da fêmea desta espécie.

A zona de crescimento do sistema reprodutor da fêmea é a região do ovário, onde oócitos crescem gradualmente em tamanho. Nesta região, os oócitos primários estão arranjados em torno da raquis central. No presente estudo, é descrito o ovário completamente preenchido com oócitos primários, similar ao observado em *A. lumbricoides*, *A. lumbricoides* var. *suum*, *O. volvulus*, *D. vitae* e *W. bancrofti* (Foor, 1967; Prestage, 1960; Franz & Büttner, 1983; McLaren, 1973; Peixoto, 2005). Prestage (1960) sugere que a raquis é um reservatório, cuja função é facilitar a busca de materiais nutritivos para os oócitos primários ou servem como um reservatório no qual certos constituintes do oócito primário são expelidos. Foor (1967) observou a presença de microtúbulos nas pontes citoplasmáticas, sugerindo que uma função da raquis é promover suporte físico para os oócitos. Contudo, sua função ainda é debatida.

O oócito primário de *L. chagasfilhoi* tem um citoplasma granular contendo perfis mitocondriais, retículo endoplasmático e núcleo com nucléolo, similar ao observado em *D. vitae* e *W. bancrofti* (McLaren, 1973; Peixoto, 2005). Em *Heterakis gallinarum* Schrank, 1788 estes oócitos apresentam, além das organelas observadas em *L. chagasfilhoi*, muitas inclusões lipídicas e dois tipos de grânulos eletrondensos (Lee

& Lestan, 1971). Inclusões lipídicas e partículas de glicogênio também têm sido observadas em *A. lumbricoides* var. *suum* (Prestage, 1960), enquanto em *A. lumbricoides* a presença de vesículas adjacentes aos grânulos refringentes e às inclusões lipídicas foram observadas (Foor, 1967). Isto provavelmente pode ser explicado pelo diferente desenvolvimento embrionário destes nematóides, cuja larva permanece por um longo período dentro do ovo e este ovo precisa permanecer viável por um longo período no meio ambiente, necessitando assim de uma maior quantidade de reserva nutricional para as larvas.

A parede uterina de *L. chagasfilhoi* consiste de fibras musculares envolvidas por uma lâmina basal e por um epitélio uterino abaixo desta lâmina, similar ao descrito em *O. volvulus* e *Brugia pahangi* (Franz & Büttner, 1983; Pilakasiri *et al.*, 2005). Franz, em 1988, descreveu que as células epiteliais da parede uterina podem ser divididas em três regiões: próximo à lâmina basal há a presença de um labirinto baso-lateral; na região média há a presença de organelas celulares tais como retículo endoplasmático, perfis mitocondriais e núcleo; e a região mais próxima do lúmen apresenta um aspecto esponjoso. Esta descrição está de acordo com o observado em *L. chagasfilhoi*. O mesmo foi observado em *B. pahangi* por Pilakasiri *et al.*, (2005), mas estes autores descreveram o labirinto baso-lateral como dobras basais. Peixoto (2005) observou a presença de duas ramificações no útero de *W. bancrofti* por microscopia confocal. Contudo, estas ramificações não foram observadas em *L. chagasfilhoi* por microscopia eletrônica de transmissão.

Os espermatozóides de *L. chagasfilhoi* dentro do trato feminino contêm perfis mitocondriais, cromossomos e organelas membranosas, similares ao observado em *D. vitae* e *Panagrellus silusiae* Goodey, 1945 (McLaren, 1973; Pasternak & Samoiloff,

1972). Contudo, estes autores observaram que os espermatozoides amebóides presentes dentro do trato feminino das fêmeas apresentam quase todas as organelas membranosas ligadas à membrana plasmática. No presente estudo, as organelas membranosas raramente estavam conectadas à membrana plasmática do espermatozoide.

A observação dos espermatozoides de *L. chagasfilhoi* em cortes longitudinais demonstrou a presença de uma região com organelas e outra região sem organelas. O mesmo foi observado por Foor *et al.* (1971) em *D. vitae*, onde 24 horas após a inseminação, o espermatozoide se tornou amebóide e apresentou uma região sem organelas considerada anterior e outra região contendo numerosas organelas considerada posterior por estes autores. A espermatogênese de *L. carinii* foi descrita por Taylor (1960) por microscopia de luz. Eles observaram que os espermatozoides são células com um citoplasma contendo um núcleo mais escuro apresentando quatro ou cinco cromossomos densos. Estes cromossomos densos também foram observados em *L. chagasfilhoi*, livres de um envelope nuclear. Embora muitos autores tenham descrito estes cromossomos como sendo núcleo (Lee, 1971; Foor, 1968), um núcleo típico não foi observado em nenhum destes espermatozoides. Na maioria destes espermatozoides de nematóides estes núcleos consistem de uma massa condensada de cromatina, com o envelope nuclear ausente. Então, nós concordamos com McLaren (1973) em chamar estas organelas eletrondensas de cromossomos, e não núcleos.

As organelas membranosas dos espermatozoides, observadas em muitas espécies de nematóides, têm sido chamadas por diferentes nomes, e diferentes funções têm sido a elas atribuídas. Jamuar (1966) descreveu as organelas membranosas de *Nippostrongylus brasiliensis* como inclusões mitocôndria-like. Lee (1971) sugeriu que estas estruturas, observadas em *H. gallinarum*, são vesículas contendo fosfatase ácida, as quais são

geradas pelo complexo de Golgi. McLaren (1973) sugeriu que as organelas membranosas de *D. vitae* estão relacionadas à produção de uma secreção envolvida na reação de fertilização, e esta função pode ser comparável ao acrossomo do espermatozóide típico. Após a fertilização, dentro do útero, estão alguns zigotos envolvidos por uma casca de ovo bem definida, contendo um núcleo, nucléolo e muitos perfis mitocondriais (Rogers *et al.*, 1976). Contudo, Rogers *et al.* (1976) não observaram a presença de bactérias.

Durante o desenvolvimento, os oócitos se diferenciam em embriões com um maior número de células. Estes embriões são muito similares aos observados em *Brugia malayi* (Vincent *et al.* 1975) e em *B. pahangi* (Rogers *et al.*, 1976). Contudo, em *L. chagasfilhoi* observamos a presença de bactérias *Wolbachia*-like nos embriões, que não foram referidas por estes autores.

As microfilárias de algumas espécies de filarídeos tais como *W. bancrofti*, *B. malayi*, *B. pahangi* and *Litomosoides* spp. são recobertas por uma bainha frouxa que corresponde à casca do ovo que fica retida após a eclosão (Schraermeyer *et al.*, 1987a). Esta bainha é importante porque representa uma área de interação entre o parasito e o hospedeiro. As microfilárias mais próximas da parede uterina têm sua bainha em íntimo contato com o epitélio, e nesta região há uma grande quantidade de vesículas no citoplasma próximo a membrana epitelial em contato com as microfilárias. Estas vesículas também foram observadas em *B. pahangi* por Rogers *et al.* (1976) e por Pilakasiri *et al.* (2005). Estes autores sugerem que o material secretado por estas vesículas tem uma função nutritiva. Para Pilakasiri *et al.* (2005) a presença do retículo endoplasmático, complexo de Golgi e bordas luminares fimbriadas do epitélio uterino indicam a grande capacidade de síntese e secreção de material nutritivo para as

microfilárias. Eles também acreditam que estas vesículas secretoras contribuam para formar componentes da casca do ovo. Moraes-Neto *et al.* (2001) usaram a técnica de deep-etching para estudar as microfilárias de *L. chagasfilhoi* e observaram uma matriz preenchendo o espaço entre a bainha e a microfilária que provavelmente corresponde ao material uterino excretado/ secretado.

Uma característica marcante do sistema reprodutor da fêmea de *L. chagasfilhoi* foi a presença de bactérias nos oócitos, zigotos, embriões, microfilárias e cordões hipodermis. Estas bactérias medem de 0.35 a 0.85 μm , e provavelmente pertencem ao gênero *Wolbachia*.

Wolbachia sp. têm sido observada em diversos filarídeos tais como *D. immitis*, *O. volvulus*, *B. malayi* e *B. pahangi* (Mclaren *et al.*, 1975; Kozek & Horacio-Figueroa, 1977; Kozek, 1977; Vincent *et al.*, 1975). Peixoto *et al.* (2001) observaram a ultraestrutura e a distribuição de bactérias endossimbiontes nos tecidos de *W. bancrofti* por microscopia eletrônica de transmissão. Kramer *et al.* (2003) descreveram resultados marcando *Wolbachia* por imunohistoquímica e imunocitoquímica utilizando anticorpos policlonais contra a proteína de superfície de *Wolbachia* (WSP) em *D. immitis* e *B. pahangi*. *Litomosoides sigmodontis* Chandler, 1931 foi estudado por microscopia eletrônica de transmissão e por imunohistoquímica utilizando anticorpo anti-proteína de choque térmico-60 (Hoerauf *et al.*, 1999). contudo, esta bactéria não foi observada em *Acantocheilonema vitae*, *Onchocerca flexuosa*, *Loa loa* e *Setaria equina* (Bandi *et al.*, 1998; Henkle-Dührsen *et al.*, 1998; Buttner *et al.*, 2003; Chirgwin *et al.*, 2002).

Estudos recentes indicam que *Wolbachia* sp. é requerida para o sucesso da muda, assim como para a reprodução dos nematóides filariais. Então, o uso de uma terapia com antibiótico anti-*Wolbachia* é um método possível para o tratamento das

filariases, contribuindo para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para estas doenças (Hise *et al.*, 2004).

A expansão dos programas de filariose linfática em todos os países tem sido acompanhada por um período de monitoramento da combinação de duas drogas: (1) ivermectina e albendazol (Na África e no Yemen); (2) DEC e albendazol (onde oncocercose não é co-endêmica na África, e em todas as outras regiões endêmicas). Contudo, estudos são necessários, uma vez que albendazol não é registrado como tratamento para filariose linfática, apesar de seu extensivo e seguro uso no controle de helmintos intestinais (Molyneux *et al.*, 2003).

Albendazol, como outros benzimidazóis, age inibindo a β -tubulina polimerase, causando despolimerização do microtúbulo e modificações celulares (Lacey, 1990; Horton, 2000). Não obstante, seu detalhado mecanismo de ação, principalmente em filariídeos, ainda não é claro. Dietilcarbamazina (DEC), apesar de ser conhecida por mais de 50 anos, e de ser amplamente utilizada em doses administradas nas áreas endêmicas, não tem seu mecanismo de ação conhecido (Maizels & Denham, 1992). Sabe-se que DEC apresenta principalmente propriedades microfilaricidas, mas seus efeitos sobre os vermes adultos ainda estão sendo investigados.

A avaliação dos efeitos de diferentes drogas na microfilaremia de *Mansonella perstans* demonstrou que mebendazol parece ser mais ativo que DEC. Contudo, a combinação dos tratamentos de DEC com albendazol resultaram numa atividade significativamente mais elevada do que nos tratamentos com apenas uma droga (Bregani *et al.*, 2006). Em um estudo que comparou a co-administração de albendazol + DEC com DEC sozinho, foi demonstrado que a combinação das duas drogas foi mais eficaz na diminuição da prevalência da microfilaremia de *W. bancrofti* comparado com DEC

sozinho. Deste modo, concluiu-se que a dose única anual que combina DEC + albendazol tem um efeito aumentado quando comparado com a terapia utilizando apenas uma droga (Rajendran *et al.*, 2004, 2006). Controversamente, num estudo baseado em exames físicos e por ultra-sonografia em homens com *W. bancrofti*, foi sugerido que a dose única co-administrada com albendazol pode inibir o efeito macrofilaricida de DEC (Dreyer *et al.*, 2006).

Em gerbis infectados com *B. pahangi*, DEC não apresentou atividade contra as microfilárias após o tratamento dos mesmos com 300 mg/kg por cinco dias, administrados oralmente ou intraperitonealmente. Em gatos, após a administração de 25 ou 50 mg de DEC intraperitonealmente por 3 ou 5 vezes, verificou-se que as microfilárias desapareceram da circulação sanguínea em uma hora, mas algumas horas depois elas reapareceram em mesmo número. Contudo, a maioria dos vermes adultos morreu 30 dias após o tratamento (Denham *et al.*, 1978).

Em experimentos utilizando *Mastomys natalaensis* (Smith, 1834) infectados com *L. carinii* foi verificado que, após a administração de 500 mg/kg via oral, os roedores que possuíam uma infecção mais antiga obtiveram uma redução da microfilaremia 15 minutos após a administração da droga. Estes níveis se mantiveram baixos, mas, 12 dias depois começaram a aumentar. Em roedores com infecções mais recentes, no entanto, a microfilaremia reduziu em 15 minutos, mas após 30 minutos começou a aumentar, e 12 dias depois este aumento foi ainda mais significativo. Já em roedores que não possuíam vermes adultos mas foram feitos microfilarêmicos através de injeções de microfilárias, a microfilaremia reduziu após o tratamento e permaneceu suprimida mesmo após o dia 12. Deste modo, concluiu-se que o ressurgimento das microfilárias após o tratamento com DEC é um resultado da liberação de novas

microfilárias pelas fêmeas (Weiner & Soulsby, 1982).

Mais recentemente, a atividade microfilaricida de dec foi verificada em gerbis contra vermes adultos de *b. pahangi*, onde os roedores infectados foram tratados com 200 mg/kg de dec intraperitonealmente e verificou-se que o nível da microfilaremia diminuiu bastante logo após o tratamento, mas começou a aumentar após 16 semanas, sugerindo que dec suprimiu temporariamente a embriogênese das fêmeas (Fujimaki *et al.*, 2004).

Após o tratamento com dec ou com albendazol sozinhos, a ultraestrutura da parede do corpo da fêmea permaneceu intacta independente da concentração. a cutícula apresentou 5 camadas, conforme descrito por Moraes-Neto *et al.* (2002) por microscopia eletrônica de transmissão. as bactérias *Wolbachia*-like presentes no cordão hipodermal não apresentaram alteração em sua ultraestrutura após o tratamento.

O estudo de alterações morfológicas de *L. carinii* por microscopia eletrônica de transmissão após o tratamento com derivados de benzotiazol *in vivo* demonstrou que o arranjo das fibras musculares foi alterado 4 dias após o tratamento. Muitos filamentos foram substituídos por um material fibroso ou granular, e muitos vacúolos apareceram na musculatura. Seis a 14 dias após o tratamento a maioria das miofibrilas desapareceu e apenas poucos perfis mitocondriais localizados próximo à borda celular interna foram observados (Franz *et al.*, 1987). Contudo, nenhum efeito deletério do tratamento foi encontrado na cutícula, hipoderme ou cordão lateral, similar ao observado em *L. chagasfilhoi* após o tratamento com DEC ou albendazol sozinhos.

As observações da ultraestrutura de *B. malayi* e *L. carinii* após 3 dias de tratamento *in vivo* com flubendazol demonstrou uma hipoderme eletrondensa e vacuolizada, indicando necrose. Após 6 dias de tratamento as células musculares

estavam vacuolizadas. Estes resultados provavelmente foram observados porque esta droga não foi administrada como uma dose oral única como realizado no presente estudo, mas os roedores foram submetidos ao tratamento com 25 mg/ kg de flubendazol subcutâneo por cinco dias consecutivos (Franz *et al.*, 1990).

A observação da parede do corpo de *L. chagasfilhoi* após o tratamento com diferentes concentrações da co-administração de DEC + albendazol mostrou a presença de diversos vacúolos na hipoderme e na região não-contrátil da camada muscular. O cordão hipodermal apresentou, além de vacúolos, figuras de mielina em algumas regiões. Em *L. carinii* Schneider, 1866 após quatro dias de tratamento com derivados de benzotiazoles *in vivo*, foi observado que as fibrilas da camada muscular tiveram seu arranjo alterado e diversos vacúolos foram observados (Franz *et al.*, 1987). Um resultado similar foi observado em *Heterakis spumosa* após tratamento *in vivo* com febantel, onde vacúolos foram observados na hipoderme e na região não-contrátil da camada muscular. Estes danos foram intensificados quando febantel foi co-administrado com pirantel, sugerindo que um efeito sinérgico é causado quando as duas drogas são co-administradas (Mehlhorn & Harder, 1997). No presente trabalho, nós verificamos que a co-administração de DEC com albendazol apresenta uma ação na hipoderme e na camada muscular de *L. chagasfilhoi* que não foi observada quando estas drogas foram administradas isoladamente. Um resultado similar foi verificado por Oliveira-Menezes *et al.* (2007), onde a observação por microscopia eletrônica de varredura de vermes adultos de *W. bancrofti* provenientes de pacientes tratados com a co-administração de DEC com albendazol apresentaram danos na superfície cuticular, enquanto os vermes adultos provenientes de pacientes tratados apenas com DEC não apresentaram estes danos.

A principal área de ação de albendazol em *L. chagasfilhoi* foi o sistema reprodutor feminino. Em nematóides tratados com 40 mg de albendazol a parede uterina apresentou um labirinto baso-lateral com uma maior quantidade de invaginações e contendo figuras de mielina, indicando alterações nesta região. Na região em que a bainha das microfilárias faz contato com o epitélio uterino havia uma grande quantidade de vesículas, similar ao observado no controle. Estas vesículas, observadas em outros filarídeos, provavelmente têm uma função nutritiva e contribuem para a formação da casca do ovo (Rogers *et al.*, 1976; Pilakasiri *et al.*, 2005). Em nematóides tratados com 80 mg de albendazol, contudo, a parede uterina não apresentou nenhuma alteração, havendo uma menor quantidade de invaginações no labirinto baso-lateral e de vesículas na região próxima ao lúmen. Os nematóides que foram submetidos ao tratamento com 6 mg/kg de DEC + 40 mg de albendazol apresentaram um epitélio uterino com uma quantidade de invaginações na região do labirinto baso-lateral bastante exacerbada e com áreas eletrondensas, havendo a formação de vacúolos em algumas regiões. Os nematóides submetidos à ação de 12 mg/kg de DEC + 80 mg de albendazol também demonstraram um aumento das invaginações do labirinto baso-lateral, além da presença de vacúolos e vesículas no epitélio uterino.

A maioria dos embriões de *L. chagasfilhoi* tratados com 40 mg de albendazol estava completamente degenerada, sem células íntegras. No entanto, alguns embriões não foram afetados pela droga, ficando inalterados. Franz *et al.* (1990) observaram que 24 horas após o tratamento subcutâneo com flubendazol contra *B. malayi* e *L. carinii*, os embriões não apresentavam núcleo, a cromatina estava condensada, levando a posterior desintegração de todos os embriões. Um efeito similar foi observado após o tratamento com as diferentes concentrações de DEC + albendazol, onde os embriões

apresentavam uma completa desorganização celular, vacúolos e figuras de mielina.

Após o tratamento com 40 mg de albendazol muitas, mas não todas as microfilárias de *L. chagasfilhoi* se encontravam num estado degenerativo. Em *L. chagasfilhoi* tratadas com 80 mg de albendazol todas as microfilárias estavam completamente decompostas. Alterações nas microfilárias também foram observadas em *L. carinii* após tratamento com derivados de benzotiazole onde vacuolização e ocorrência de zonas plasmáticas pálidas foram observadas (Franz *et al.*, 1987). Os efeitos de benzimidazoles também foram observados em células em divisão dos ovários de *D. immitis* (Howells & Delves, 1985) e em *B. malayi* e *L. carinii* foi observado que os danos dos microtúbulos nas células em divisão levam à degradação celular, afetando a zona geminal do ovário (Franz *et al.*, 1990). O estudo dos efeitos de mebendazol em *O. volvulus* demonstrou que esta droga tem um marcante efeito embriotóxico em fêmeas adultas (Awadzi *et al.*, 1982). Em fêmeas de *A. lumbricoides* e *Dictyocaulus viviparus* (Bloch, 1782) foram observados ovos não embrionados após administração com albendazol, sugerindo a alta efetividade desta droga na embriogênese (Carvalho *et al.*, 1992; Osman *et al.*, 1994).

Os nematóides que sofreram ação de 6 mg/kg de DEC apresentaram alguns embriões completamente degenerados. No entanto, alguns ainda se encontravam íntegros. O mesmo foi observado na porção mais proximal do útero, onde microfilárias estavam completamente degeneradas, mas algumas se encontravam sem nenhuma alteração. Os nematóides que sofreram ação de 12 mg/kg de DEC tiveram o aspecto de grande parte de seus embriões completamente alterados, iniciando um processo degenerativo. Já na região do útero mais próxima da vulva foram observadas microfilárias completamente degeneradas, mas também algumas microfilárias sem

alteração.

A observação de *W. bancrofti* após a administração de 6 mg/kg/dia por 12 dias ao indivíduo parasitado, demonstrou que o útero da fêmea deste filarídeo apresenta algumas regiões contendo microfilárias e outras praticamente vazias. Além disso, através de microscopia eletrônica de transmissão foi observado que algumas fêmeas não apresentavam nenhum embrião intra-uterino (Peixoto, 2005).

No presente estudo, a observação das microfilárias em formação no útero das fêmeas após a administração de 6 mg/kg de DEC demonstrou que a bainha persistiu em microfilárias que já apresentavam numerosos vacúolos, com completa lise do citoplasma e organelas celulares, havendo algumas vezes uma aparência vazia. No experimento utilizando 12 mg/ kg de DEC, algumas microfilárias internamente degeneradas perderam a bainha. As microfilárias submetidas à co-administração de DEC com albendazol, também apresentaram uma completa desorganização celular, com vacuolizações. Contudo, a bainha não foi destruída.

Schardein *et al.* (1968) e Chandrashekar *et al.* (1984) sugeriram que só após a perda da bainha das microfilárias ocorrem danos celulares. Florêncio & Peixoto (2003) também reconheceram que os efeitos ultraestruturais como formação de vacúolos, citólise, desorganização celular e presença de corpos lamelares só foram observados em microfilárias que perderam sua bainha. Peixoto *et al.* (2003) viram no entanto que enquanto as microfilárias de *W. bancrofti* após o tratamento haviam perdido a bainha, as de *L. chagasfilhoi* conservaram a bainha intacta. Em 2004, Peixoto *et al.* avaliaram os efeitos de uma dose única de 6 mg/kg, via oral de DEC sobre as microfilárias de *W. bancrofti*, indicando agora que a presença da bainha não é uma condição para um dano celular subsequente, estando de acordo com os dados obtidos em nossos experimentos.

Segundo Ottesen (1984), DEC parece ter diferentes mecanismos farmacológicos de ação para diferentes espécies filariais e estágios de desenvolvimento de uma mesma espécie. Uma droga anti-filarial análoga à DEC conjugada a fluoresceína e a rodamina foi utilizada para localizar seu sítio de atuação em *B. malayi* (Junnila *et al.*, 2007). A incubação *in vitro* desta droga por 8 horas demonstrou seu acúmulo na faringe, esôfago, anel nervoso, útero, vulva e testículo. Nas microfilárias este acúmulo foi observado na região do poro excretor, poro anal e núcleos das células somáticas das microfilárias (Junnila *et al.*, 2007). Estes dados indicam que este análogo de DEC acumula em áreas de síntese de proteínas de secreção, sugerindo que DEC pode interferir nos mecanismos de escape.

Apesar de estudos prévios demonstrarem uma alteração na ultraestrutura de células intestinais de *A. suum*, *Aspicularis tetraptera* (Nitzsch, 1821) e *Heterakis spumosa* (Schneider, 1866) após o tratamento com benzimidazóis (Borges & Nollin, 1975; Comley, 1980; Zintz & Frank, 1982), as células intestinais de *L. chagasfilhoi* permaneceram intactas mesmo após o tratamento com 80 mg de albendazol, ou com a co-administração de 12 mg/ kg de DEC com 80 mg de albendazol. No entanto, é importante ressaltar que *L. chagasfilhoi* está presente na cavidade celomática do roedor, enquanto os demais nematóides são gastrointestinais, sofrendo a ação da droga ingerida mais diretamente. O padrão normal das células intestinais de *L. chagasfilhoi* após o tratamento coincide com o observado por Franz *et al.* (1987) e Franz *et al.* (1990) que estudaram as células intestinais de *L. carinii* e *B. malayi* que também permaneceram morfológicamente intactas após o tratamento com benzotiazoles ou flubendazoles. As células do epitélio intestinal de *L. chagasfilhoi* tratados e não tratados apresentaram junções septadas, de acordo com o padrão descrito por Davidson (1983) em *Ascaris* sp.

No citoplasma das células intestinais foi possível observar vacúolos, corpos lisossomais e inclusões lipídicas, similar ao observado por Moraes-Neto *et al.* (2006).

O presente trabalho elucida muitos aspectos ultraestruturais do sistema reprodutivo da fêmea de *L. chagasfilhoi*, fornecendo uma melhor compreensão da ontogenia deste nematóide. Além disto, a presença de bactérias *Wolbachia*-like está sendo referida pela primeira vez nesta espécie, mostrando a grande importância deste modelo de estudo. A detecção desta bactéria em *L. chagasfilhoi* pode ser feita por microscopia eletrônica de transmissão sem a utilização de um anticorpo, facilitando a observação da avaliação de drogas.

Muitos estudos investigam a efetividade de albendazol em potencializar o tratamento com DEC em administração em massa. A Índia, que é o maior país envolvido no programa de eliminação da filaríase, estava hesitando até recentemente em utilizar o regime com duas drogas devido à ausência de evidências que demonstrem os efeitos benéficos do albendazol (Sabesan, 2006). Desta forma, este estudo contribui para o conhecimento dos efeitos de albendazol, dec e da co-administração de DEC + albendazol nos filarídeos e enfatiza o potencial embriotóxico e microfilaricida destas drogas. Através da observação das fêmeas por microscopia eletrônica de transmissão fica evidente que o albendazol é o principal responsável por este papel microfilaricida e embriotóxico, uma vez que administração de apenas esta droga ofereceu uma redução maior na microfilaremia do que quando dec foi administrado sozinho. Contudo, verificamos que há uma ação potencializadora destas duas drogas, uma vez que após a co-administração de 12 mg/kg de dec com 80 mg de albendazol não verificamos nenhuma microfilária íntegra por microscopia eletrônica de transmissão e foram observadas alterações na hipoderme, cordão hipodermal e camada muscular que não

foram observadas em nenhum nematóide em que foram tratados com apenas uma droga.

6. CONCLUSÕES

- A ultraestrutura do sistema reprodutor da fêmea de *Litomosoides chagasfilhoi* está sendo descrita pela primeira vez por microscopia eletrônica de transmissão;
- Espermzóides aflagelados e amebóides presentes na porção proximal do útero de *L. chagasfilhoi* foram observados pela primeira vez por microscopia eletrônica de transmissão;
- As fêmeas de *L. chagasfilhoi* apresentam bactérias *Wolbachia-like* nos oócitos, zigotos, embriões, microfilárias e cordões hipodermis;
- As fêmeas de *L. chagasfilhoi* não apresentaram nenhuma alteração na parede do corpo após o tratamento com dec ou com albendazol administrados isoladamente;
- As fêmeas de *L. chagasfilhoi* apresentaram alteração na parede do corpo após a co-administração de dec com albendazol;
- Nenhuma microfilária permaneceu íntegra no interior do útero após a administração de 80 mg de albendazol e da co-administração de 12 mg/kg de dec com 80 mg de albendazol;

- A degeneração celular das microfilárias independe da destruição da bainha;
- O albendazol, dec e a co-administração de dec + albendazol apresentam efeitos sobre os embriões e as microfilárias intra-uterinos de *L. chagafilhoi*.

7. REFERÊNCIAS

Alves LC, Brayner FAS, Silva L F, Peixoto CA (2005) The ultrastructure of infective larvae (L3) of *Wuchereria bancrofti* after treatment with diethylcarbamazine. *Micron* 36: 67-72

Araújo A, Souto-Padron T, De Souza W (1993) Cytochemical localization of carbohydrate residues in microfilariae of *Wuchereria bancrofti* and *Brugia malayi*. *J Histochem Cytochem.* 41:571-8.

Araújo A, Souto-Padrón T, De Souza W (1994) An ultrastructural, cytochemical and freeze-fracture study of the surface structures of *Brugia malayi* microfilariae. *Int J Parasitol* 24: 899-907.

Araújo A, Souto-Padrón T, De Souza, W (1995) Ultrastructural and cytochemical aspects of the cuticle of adult *Wuchereria bancrofti*. *Int J Parasitol* 25: 569-577.

Awadzi K, Schulz-Key H, Howells RE, Haddock DR, Gilles HM (1982) The chemotherapy of onchocerciasis VIII Levamisole and its combination with the

benzimidazoles. *Ann Trop Med Parasitol* 76(4): 459-73.

Babu BV, Hazra RK, Chhotray GP, Satyanarayana K (2004) Knowledge and beliefs about elephantiasis and hydrocele of lymphatic filariasis and some socio-demographic determinants in an endemic community of Eastern India. *Public Health* 118 (2):121-7.

Bandi C, Anderson TJ, Genchi C, Blaxter ML (1998) Phylogeny of *Wolbachia* in filarial nematodes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 265:2407-13.

Bandyopadhyay L (1996) Lymphatic filariasis and the women of India. *Soc Sci Med* 42: 1401-1410.

Beau de Rochars M, Direny A, Roberts J, Addiss D, Radday J, Beach M, Streit T, Desire D, Lafontant, J, Lammie PJ (2004) Community-wide reduction in prevalence and intensity of intestinal helminthes as a collateral benefit of lymphatic filariasis elimination programs. *Am J Trop Med Hyg* 71: 466-470.

Bertram DS (1947) The period required by *Litomosoides carinii* to reach the infective stage in *Liponyssus bacoti*, and the duration of the mites` infectivity. *Ann. Trop. Med. Parasit.* 41: 253-261.

Bertram DS (1965) Dynamics of the parasitic equilibrium in cotton rat filariasis. *Adv. Parasitol.* 4: 255-319.

Betram DS, Unsworth K, Gordon RM (1946) The biology and maintenance of *Lyponyssus bacoti* Hirst, 1913, and an investigation into its role as a vector of *Litomosoides carinii* to cotton rats and white rats, together with some observations on the infection in the white rats. *Ann Trop Med Parasit* 40: 228-254.

Blaxter MP, Page AP, Rudin W, Maizels RM (1992) Nematode surface coats: Actively evading immunity. *Parasitol. Today* 8: 243-247.

Borges M, Nollin S (1975) Ultrastructural changes in *Ascaris suum* intestine after mebendazole treatment *in vivo*. *J Parasitol* 61: 110-122.

Brattig NW, Buttner DW, Hoerauf A (2001) Neutrophil accumulation around *Onchocerca* worms and chemotaxis of neutrophils are dependent on *Wolbachia* endobacteria. *Microbes Infect.* 3:439-46.

Brattig NW, Rathjens U, Ernst M, Geisinger F, Renz A, Tischendorf FW (2000) Lipopolysaccharide-like molecules derived from *Wolbachia* endobacteria of the filaria *Onchocerca volvulus* are candidate mediators in the sequence of inflammatory and antiinflammatory responses of human monocytes. *Microbes Infect* 2:1147-57.

Bregani ER, Rovellini A, Mbaidoum N, Magnini NG (2006) Comparasion of different antihelminthic drug regimens against *Mansonella perstans* filariasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 100: 458-463.

Burr AHJ, Gans C (1998) Mechanical significance of obliquely striated architecture in nematode muscle. *Biol Bull* 194: 1-6.

Buttner DW, Wanji S, Bazzocchi C, Bain O, Fischer P (2003) Obligatory symbiotic *Wolbachia* endobacteria are absent from *Loa loa*. *Filaria J* 2: 10.

Carvalho OS, Guerra HL, Massara CL (1992) Development of *Ascaris lumbricoides* eggs from females eliminated after chemotherapy in man. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 87: 49-51.

Chabaud AG (1975) *CIH keys to the nematode parasites of vertebrates*. N° 3: Keys to genera of the order Spirurida. Part I. Camallanoidea, Dracunculoidea, Gnathostomatoidea, Physalopteroidea, Rictularioidea and Thelazioidea. Edited by Anderson, R. C., Chabaud, A. G. & Willmott, S. Commonwealth Agricultural Bureaux, England, 1-3.

Chandrashekar R, Rao UR, Subrahmanyam D (1984) Effect of diethylcarbamazine on serum-dependent cell-mediated immune reactions to microfilariae *in vitro*. *Tropenmed Parasitol* 35, 177-182.

Cherian PV, Stromberg BE, Weiner DJ, Soulsby EJJ (1980) Fine Structure and cytochemical evidence for the presence of polysaccharide surface coat of *Dirofilaria immitis* microfilariae. *Int J Parasitol* 10: 227-233.

Chirgwin SRK, Porthouse KH, Nowling JM, Klei, TR (2002) The filarial endosymbiont *Wolbachia* sp. Is absent from *Setaria equina*. J Parasitol 88: 1248-1250.

Chitwood, BG (1974) Introduction. In Introduction to Nematology. Pgs 1-17. Chitwood, B.G. & Chitwood, M.B. (Eds.) University Park Press. Baltimore, London, Tokio.

Comley JCW (1980) Ultrastructure of the intestinal cells of *Aspiculuis tetraptera* after *in vivo* treatment of mice with mebendazole and thiabendazole. Int J Parasitol 10: 143-150.

Cox GN, Kush M, Edgar RS (1981) Cuticle of *Caenorhabditis elegans*: its isolation and partial characterization. J Cell Biol 90: 7-17.

Cox GN (1990) Molecular biology of the cuticle collagen gene families of *Caenorhabditis elegans* and *Haemonchus contortus*. Acta Trop 47: 269-281.

Crompton DWT (1999) How much helminthiasis is there in the world? J Parasitol 85: 397-403.

Cross HF, Haarbrink M, Egerton G, Yazdanbakhsh M, Taylor MJ (2001) Severe reactions to filarial chemotherapy and release of *Wolbachia* endosymbionts into blood. Lancet 358:1873-5.

Davidson LA (1983) A freeze fracture and thin section study of the intestinal cell membranes and intercellular junctions of a nematode, *Ascaris*. *Tissue and Cell* 15 (1): 27-37.

Davies P, Bailey PJ, Golberg MM., Ford-Hutchinson AW (1984) The role of arachidonic acid oxygenation products in pain and inflammation. *Annu Rev Immunol* 2: 335-357.

De Souza W, Souto-Padrón T, Dreyer G, Dias de Andrade L (1989) Fine structure and localization of anionic sites on the surface of microfilariae *Wuchereria bancrofti*. *J Submicrosc Cytol Pathol* 21: 121-129.

Denham DA, Suswillo RR, Rogers R, McGreevy PB (1978) Studies with *Brugia pahangi* 17. The anthelmintic effects of diethylcarbamazine. *J Parasitol* 64(3):463-8.

Dreyer G, Addiss D, Williamson J, Norões J (2006) Efficacy of co-administered diethylcarbamazine and albendazole against adult *Wuchereria bancrofti*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 100 (12):1118-25.

Dreyer G, Norões J, Addiss D (1997) The silent burden of sexual disability associated with lymphatic filariasis. *Acta Trop* 63: 57-60.

Ellis DS, Rogers R, Bianco AE, Denham DA (1978) Intrauterine development of the microfilariae of *Dipetalonema vitae*. *J Heminthol* 52: 7-10.

- Fetterer RH, Rhoads ML (1993) Biochemistry of the nematode cuticle: relevance to parasitic nematodes of livestock. *Vet Parasitol* 46: 103-111.
- Florêncio MS, Peixoto CA (2003) The effects of diethylcarbamazine on the ultrastructure of microfilariae of *Wuchereria bancrofti*. *Parasitology* 126: 551-554.
- Foor WE (1967) Ultrastructural aspects of oocyte development and shell formation in *Ascaris lumbricoides*. *J Parasitol* 53: 1245-1261.
- Foor WE (1968) Zygote formation in *Ascaris lumbricoides*. *J Cell Biol* 39: 119-134.
- Foor WE, Johnson MH, Beaver PC (1971) Morphological changes in the spermatozoa of *Dipetalonema viteae* in utero. *J Parasitol* 57: 1163-1169.
- Franz M (1988) The morphology of adult *Onchocerca volvulus* based on electron microscopy. *Trop Med Parasit* 39: 359-366.
- Franz M, Andrews P (1986) Histology of adult *Litomosoides carinii* (Nematoda: Filarioidea). *Z Parasitenkd* 72: 387-395.
- Franz M, Büttner DW (1983) The fine structure of adult *Onchocerca volvulus*. III. The cuticle, the interchordal hypodermis and muscle cell of female worm. *Tropenmed Parasit* 34: 61-69.

Franz M, Zahner H, Benten P (1990) Fine-structure alterations in female *Brugia malayi* and *Litomosoides carinii* after *in vivo* treatment with flubendazole. Parasitol Res 76:401-5.

Franz M, Zahner H, Striebel HP, Langenstrassen L (1987) Morphological alterations in female *Litomosoides carinii* after treatment with two benzthiazole derivatives *in vivo*. Trop Med Parasitol 38:1-7.

Fuhrman JA, Piessens WF (1985) Chitin synthesis and sheath morphogenesis in *Brugia malayi* microfilariae. Mol Biochem Parasitol 17(1):93-104.

Fujimaki Y, Sithithaworn P, Mitsui Y, Aoki Y (2004) Delayed macrofilaricidal activity of diethylcarbamazine against *Brugia pahangi* in Mongolian jirds. J Helminthol 78(4):293-5.

Haddad A, Sesso A, Attias M, Farina M, Meirelles MN, Silveira M, Benchimol M, Soares MJ, Barth OM, Machado RD, Souto-Pradrón T, De Souza, W (1998) *Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às ciências biológicas*. Ed. Wanderley de Souza, Rio de Janeiro, Sociedade Brasileira de Microscopia, 179 p.

Hawking F, Laurie W (1949) Action of hetrazan on filariasis and onchocerciasis. Lancet 2: 146-147.

Hawking F, Sewell P, Thurston JP (1948) Mode of action of hetrazan in filariasis. Lancet ii, 730-731.

Henkle-Dührsen K, Eckelt VH, Wildenburg G, Blaxter, M, Walter, RD (1998) Gene structure, activity and localization of a catalase from intracellular bacteria in *Onchocerca volvulus*. Mol Biochem Parasitol 96: 69-81.

Hewitt RI, White E, Wallace WS, Stewart HW, Kushner S, Subbarow Y (1947) Experimental chemotherapy of filariasis. II. Effect of piperazine derivatives against naturally acquired filarial infections in cotton rats and dogs. J Lab Clin Med 32: 1304-13.

Himmeloch S, Kisiel MJE, Zuckerman BM (1977) *Caenorhabditis briggsae*: electron microscope analysis of changes in negative surface charge density of the outer cuticular membrane. Exp Parasitol 41: 118-123.

Hise AG, Gillette-Ferguson I, Pearlman E (2004) The role of endosymbiotic *Wolbachia* bacteria in filarial disease. Cell Microbiol 6: 97-104.

Hoerauf A, Mand S, Adjei O, Fleischer B, Buttner DW (2001) Depletion of *Wolbachia* endobacteria in *Onchocerca volvulus* by doxycycline prevents reappearance of microfilaridemia after ivermectin treatment. Lancet 357: 1415-1416.

Hoerauf A, Nissen-Pahle K, Schmetz C, Henkle-Dührsen K, Blaxter MI, Büttner DW, Gallin MY, Al-Qaoud Km, Lucius R, Fleicher B (1999) Tetracycline therapy targets intracellular bacteria in the filarial nematode *Litomosoides sigmodontis* and results in filarial infertility. *J Clin Invest* 103: 11-18.

Horton J (2000) Albendazol: A review of anthelmintic efficacy and safety in humans. *Parasitol*, 121:113-132.

Howells RE, Delves CJ (1985) A simple method for the identification of compounds which inhibit tubulin polymerization in filarial worms. *Ann Trop Med Parasitol* 79:507-12.

Hulinska D, Shaihenov B (1982) Comparative electron microscopic and cytochemical studies on the cuticle and the hypodermis of *Trichinella nativa* (Britov et Boev, 1972) and *T. pseudospiralis* (Garkavi, 1972). *Folia Parasitol. (Praha)* 29: 159-165.

Ismail MM, Jayakody RL, Weil GJ, Nirmalan N, Jayasinghe KS, Abeyewickrema W, Rezvi Sheriff MH, Rajaratnam HN, Amarasekera N, De Silva DC, Michalski ML, Dissanaik AS (1998) Efficacy of single dose combinations of albendazole, ivermectin and diethylcarbamazine for the treatment of bancroftian filariasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 92: 94–97.

Jamuar M P (1966) Studies of spermiogenesis in a Nematode, *Nippostrongylus brasiliensis*. *J Cell Biol* 31: 381-396.

Junnila A, Bohle DS, Prichard R, Perepichka I, Spina C. (2007) Fluorescent diethylcarbamazine analogues: sites of accumulation in *Brugia malayi*. *Bioconjug Chem.* 18 (6):1818-23.

Kanesa-Thanan N, Douglas JG & Kazura JW (1991) Diethylcarbamazine inhibits endothelial and microfilarial prostanoid metabolism *in vitro*. *Mol Biochem Parasitol* 49: 11-20.

Kershaw WE (1949). Observations on *Litomosoides carinii* (Travassos, 1919) Chlander, 1931. III. The first-stage larva in the peripheral circulation. *Ann Trop Med Parasitol* 43: 238-260.

Klonish I, Bardhele G, Linder D, Boschck BW, Schott HH, Zahner H, Stirms S (1991) the sheaths of *Brugia m*icrofilariae: isolation and composition. *Parasitol Res*, 77: 448-51.

Kozek WJ (1977) Transovarially-transmitted intracellular microorganisms in adult and larval stages of *Brugia malayi*. *J Parasitol* 63: 992-1000.

Kozek WJ, Horacio Figueroa M (1977) Post-prandial transportation and maintenance of *Simulium ochraceum* infected with *Onchocerca volvulus*. *Am J Trop Med Hyg* 26: 75- 9.

Kramer H, Passeri B, Corona S, Simmoncini L, Casiraghi M (2003) Immunohistochemical/ immunogold detection and distribution of the endosymbiont *Wolbachia* of *Dirofilaria immitis* and *Brugia pahangi* using a polyclonal antiserum raised against WSP (*Wolbachia* surface protein). Parasitol Res 89: 381-386.

Lacey E (1990) Mode of action of benzimidazoles. Parasitol Today 6: 112-115.

Lammie P, Milner T, Houston R (2007) Unfulfilled potential: using diethylcarbamazine-fortified salt to eliminate lymphatic filariasis. Bull World Health Organ. 85(7): 545-9.

Laurence BR (1989) The global dispersal of bancroftian filariasis. Parasitol. Today 5: 260-264.

Laurence BR, Simpson MG (1971) The microfilaria of *Brugia*: a first stage nematode larva. J Helminthol 45 (1): 523-36.

Laurence BR, Simpson MG (1974) The ultrastructure of the microfilaria of *Brugia*, Nematoda: Filarioidea. Int J Parasitol 4(5): 523-536.

Lee DL (1965) The cuticle adult *Nippostrongylus brasiliensis*. Parasitology 86: 173-181.

- LEE DL (1971) The structure and development of the spermatozoon of *Heterakis gallinarum* (Nematoda). *J Zool* 164: 181-187.
- Lee DL (1977) The nematode epidermis and collagenous cuticle, its formation and ecdysis. *Symposium of the Zoological Society of London* 39: 145-170.
- Lee DL, Lestan P (1971) Oogenesis and egg shell formation in *Heterakis galinarum* (Nematoda). *J Zool* 164: 189-196.
- Lee DL, Wright KA, Shivers RR (1993) A freeze-fracture study of the cuticle of adult *Nippostrongylus brasiliensis* (Nematoda). *Parasitology* 107: 545-552.
- Liu J, Chen Z, Huang X, Tu Z (1992) Mass treatment of filariasis using DEC-medicated salt. *J Trop Med Hyg.* 95(2):132-5.
- Lumsden DR (1975) Surface ultrastructure and cytochemistry of parasitic helminths. *Exp Parasitol* 37: 267-339.
- Mackenzie CD, Preston PM, Ogilvie BM (1978) Immunological properties of the surface of parasitic nematodes. *Nature* 276: 826-828.
- Maizels RM, Blaxter ML, Selkirk ME (1993) Forms and functions of nematode surfaces. *Exp Parasitol* 77: 380-384.

Maizels RM, Denham DA (1992) Diethylcarbamazine (DEC): immunopharmacological interactions of anti-filarial drug. *Parasitology* 105: S49-S60.

Mak JW (2004) Antifilarial compounds in the treatment and control of lymphatic filariasis. *Trop Biomed* 21(2): 27-38.

Manson Bahr P (1952) Future research on filariasis in Fiji. *Trans Soc Trop Med Parasitol* 46: 301-326.

Martin RJ, Robertson AP, Bjorn H (1997) Target of anthelmintics. *Parasitol.*, 114, S111-S124.

Martinez AMB, De Souza W (1995) A quick-frozen, freeze-fracture and deep-etch study of cuticle and hypodermis of adults forms of *Strongyloides venezuelensis* (Nematoda). *Parasitology* 111: 523-529.

Martinez AMB, De Souza W (1997) A freeze-fracture and deep-etch study of cuticle and hypodermis of infective larvae of *Strongyloides venezuelensis* (Nematoda). *Int J Parasitol* 111: 523-529.

McLaren DJ (1972) Ultrastructural studies on microfilariae (Nematoda: Filarioidea). *Parasitology* 65(2): 317-32.

McLaren DJ (1973) Oogenesis and fertilization in *Dipetalonema viteae* (Nematoda:

Filarioidea). Parasitology 66: 465-472.

McLaren DJ, Worms MJ, Laurence BR, Simpson MG (1975) Micro-organisms in filarial larvae (Nematoda). Trans R Soc Trop Med Hyg 69: 509-514.

Mehlhorn H, Harder A (1997) Effects of the synergistic action of febantel and pyrantel on the nematode *Heterakis spumosa*: a light and transmission electron microscopy study. Parasitol Res 83 (5):419-34.

Michael E, Bundy DAP (1997) Global mapping of lymphatic filariasis. Parasitol. Today 13: 472-476.

Molyneux DH, Bradley M, Hoerauf A, Kyelem D, Taylor MJ (2003) Mass drug treatment for lymphatic filariasis and onchocerciasis. Trends Parasitol. 19(11): 516-22.

Moraes-Neto AHA, Cunha GSP, Ferreira TF, Carvalho SN, Guimarães EV, De Souza W (2006) Fine Structure and cytochemical analysis of the intestinal wall along the body of adult female of *Litomosoides chagasfilhoi* (Nematoda: Filarioidea). Parasitol Res 98: 525-533.

Moraes-Neto AHA, Lanfredi RM, De Souza W (1997) *Litomosoides chagasfilhoi* sp. nov. (Nematoda: Filarioidea) parasitizing the abdominal cavity of *Akodon cursor* (Winge, 1887) (Rodentia: Muridae) from Brazil. Parasitol Res 83: 137-143.

Moraes-Neto AHA, Lanfredi RM, De Souza W (2001) Fine structure, freeze-fracture and deep-etch views of the sheath and cuticle of microfilariae of *Litomosoides chagasfilhoi* (Nematoda: Filarioidea). *Parasitol Res* 87: 1035-1047.

Moraes-Neto AHA, Lanfredi RM, De Souza W (2002) Deep-etched view of the cuticle of adults of *Litomosoides chagasfilhoi* (Nematoda: Filarioidea). *Parasitol Res* 88: 849-854.

Moraes-Neto AHA, Lanfredi RM, Gadelha C, Cunha-e-Silva NL, Simão RA, Achete C, De Souza W (2003) Further studies on the ultrastructural analysis of the cuticle of *Litomosoides chagasfilhoi* (Nematoda: Filarioidea). *Parasitol Res* 89: 397-406.

Oliveira-Menezes A, Lins R, Norões J, Dreyer G, Lanfredi RM (2007) Comparative analysis of a chemotherapy effect on the cuticular surface of *Wuchereria bancrofti* adult worms *in vivo*. *Parasitol Res* 101:1311-1317.

Oliveira-Menezes A, De Souza W, Lanfredi RM (2003) Cuticular Architecture of *Hassalstrongylus epsilon* (Nematoda: Trichostrongyloidea). *Parasitol Res* 90:280-286.

Osman AM, Jacobs DE, Plummer JM (1994) *In vivo* effects of sublethal concentrations of albendazole metabolites on the structure of reproductive organs of *Dictyocaulus viviparus*. *J Helminthol* 68: 161-166.

- Ottesen EA (1984) Immunological aspects of lymphatic filariasis and onchocerciasis in man. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 78 Suppl, 9-18.
- Ottesen EA (1993) Filarial infections. *Infect Dis Clin North Am* 7(3): 619-33.
- Ottesen EA, Duke BO, Karam M, Behbehani K (1997) Strategies and tools for the control/elimination of lymphatic filariasis. *Bull World Health Organ* 75(6): 491-503.
- Page AP, Rudin W, Maizels RM (1992) Lectin binding to secretory structures, the cuticle and the surface coat of *Toxocara canis* infective larvae. *Parasitology* 105: 285-296.
- Partono F (1985) Diagnosis and treatment of lymphatic filariasis. *Parasitol Today* 1: 52-57.
- Pasternak J, Samoiloff, MR (1972) Cytoplasmic organelles present during spermatogenesis in the free-living nematode *Panagrellus silusiae*. *Can J Zool* 50: 147-151.
- Peixoto CA (2005) Some morphological aspects of *Wuchereria bancrofti* uterus after treatment with diethylcarbamazine. *Micron* 36: 17-22.

Peixoto CA, Alves LC, Brayner FA, Florêncio MS (2003) Diethylcarbamazine induces loss of microfilarial sheath of *Wuchereria bancrofti*. *Micron* 38: 38-385.

Peixoto CA, De Souza W (1992) Cytochemical characterization of the cuticle of *Caenorhabditis elegans* (Nematoda: Rhabditoidea). *J Submicrosc Cytol Pathol* 24: 425-435.

Peixoto CA, De Souza W (1994) Freeze-fracture characterization of cuticle of adult and dauer forms of *Caenorhabditis elegans*. *Parasitol Res* 80: 53-57.

Peixoto CA, Kramer JM, De Souza W (1997) *Caenorhabditis elegans* cuticle: A description of new elements of the fibrous layer. *J Parasitol* 83: 368-372.

Peixoto CA, Rocha A, Aguiar-Santos A, Florêncio MS (2004) The effects of diethylcarbamazine on the ultrastructure of microfilariae of *Wuchereria bancrofti* *in vivo* and *in vitro*. *Parasitol Res* 92: 513-517.

Peixoto CA, Silva LF, Teixeira KM, Rocha A (2001) Ultrastructural characterization of intracellular bacteria of *Wuchereria bancrofti*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 95: 566-568.

Piessens WF, Beldekas M (1979) Diethylcarbamazine enhances antibody-mediated cellular adherence to *Brugia malayi* microfilariae. *Nature* 282: 845-847.

Pilakasiri K, Roongruangchai J, Roongruangchai K, Pilakasiri C, Sobhon P (2005) The ultrastructure of the gravid uterus of *Brugia pahangi*, another rich source of antigen of the filarial parasite. Southeast Asian J Trop Med Public Health 36(5):1096-104.

Politz SM, Philipp M (1992) *Caenorhabditis elegans* as a model for parasitic nematodes: a focus on the cuticle. Parasitol Today 8: 6-12.

Prestage JJ (1960) The fine structure of the growth region of ovary in *Ascaris lumbricoides* var. *suum* with special reference to the rachis. J Parasitol 46: 69-78.

Proudfoot L, Kusel JR, Smith HV, Kennedy MW (1991) Biophysical properties of nematode surface. Parasitology 107: 107-117.

Proudfoot L, Kusel JR, Smith HV, Harnett W, Worms MJ, Kennedy MW (1990) The surface lipid of parasitic nematodes: organization and modifications during transition to mammalian host environment. Acta Trop 47: 323-330.

Rachou RG (1956) Vetores da filariose bancroftiana no Brasil. Rev Bras Malariol Doenças Trop 8 (1): 267-79.

Rajendran R, Sunish IP, Mani TR, Murinathinam A, Abdullah SM, Arunachalam N, Satyanarayana K (2004) Impact of two annual single-dose mass drug administrations with diethylcarbamazine alone and in combination with

albendazole on *Wuchereria bancrofti* microfilaremia and antigenaemia in South India. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 98: 174-181.

Rajendran R, Sunish IP, Mani TR, Murinathinam A, Arunachalan N, Satyanarayana K, Dash AP (2006) Community-based study to assess the efficacy of DEC plus ALB against DEC alone on bancroftian filarial infection in endemic areas in Tamil Nadu, south India. *Trop Med Int Health* 11: 851-861.

Rey, L. (2001) Nematóides parasitos do homem. *In*: Rey, L. *Parasitologia* 3^a Cap. 42: 473-484. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan.

Roberts SL, Janovy JRJ (1996) *Foundations of Parasitology*. 5th edition, WM. C. Brown publishers, USA, 658 p.

Rogers R, Ellis DS, Denham DA (1976) Studies with *Brugia pahangi*. 14. Intrauterine Development of the microfilariae and a comparison with other filarial species. *J Helminthol* 50: 251-257.

Rosenbluth J (1965) Ultrastructural organization of obliquely striated muscle fibers in *Ascaris lumbricoides*. *J Cell Biol* 25:495-515.

Ruppert E E, Barnes RD (1996) *Zoologia dos Invertebrados*. 6^a edição. Editora Roca, São Paulo, 1029 pp.

Sabesan S (2006) Albendazole for mass drug administration to eliminate lymphatic filariasis. *Lancet Infect Dis* 6(11):684-5.

Saint Andre A, Blackwell NM, Hall LR, Hoerauf A, Brattig NW, Volkmann L, Taylor M J, Ford L, Hise AG, Lass JH, Diaconu E, Pearlman E (2002) The role of endosymbiotic *Wolbachia* bacteria in the pathogenesis of river blindness. *Science* 295: 1892-5.

Santiago-Stevenson D, Oliver-Gonzalez J, Hewitt RI (1947) Treatment of filariasis bancrofti with 1-diethylcarbamil-4-methylpiperazine hydrochloride ('hetrazan'). *J Am Med Assoc* 135: 708-712.

Sayers G, Mackenzie CD, Denham DA (1984) Biochemical surface components of *Brugia pahangi* microfilariae. *Parasitology* 89: 425-434.

Schardein JL, Lucas JA, Dickerson CW (1968) Ultrastructural changes in *Litomosoides carinii* microfilariae in gerbils treated with diethylcarbamazine. *J Parasitol* 54: 351-358.

Schraermeyer U, Peters W, Zahner H (1987a). Formation by the uterus of a peripheral layer of the sheath in microfilariae of *Litomosoides carinii* and *Brugia malayi*. *Parasitol Res* 73(6): 557-64.

Schraermeyer U, Peters W, Zahner H (1987b) Lectin binding studies on adult filariae, intrauterine developing stages and microfilariae of *Brugia malayi* and *Litomosoides carinii*. Parasitol Res 73: 550-556.

Scott JA, MacDonald EM, Terman B (1951) A description of the stages in the life cycle of the filarial worm *Litomosoides carinii*. J Parasitol 37: 425-432.

Shigeno S, Fujimaki Y, Toriyama K, Ichinose A, Mitsui Y, Aoki Y, Kimura E (2006) Temporary shift of microfilariae of *Brugia pahangi* from the lungs to muscles in Mongolian jirds, *Meriones unguiculatus*, after a single injection of diethylcarbamazine. J Parasitol 92 (5):1075-80.

Simonsen PE, Magesa SM, Meyrowitsch DW, Maléesela-Lazaro MN, Rwegoshora RT, Jaoko WG, Michael E (2005) The effect of eight half-yearly single dose treatment with DEC on *Wuchereria bancrofti* circulating antigenemia. Trans R Soc Trop Med Hyg 99: 541-547.

Sironi M, Bandi C, Sacchi L, Di Sacco B, Damiani G, Genchi C (1995) Molecular evidence for a close relative of the arthropod endosymbiont *Wolbachia* in a filarial worm. Mol Biochem Parasitol 74: 223-22.

Smith JD (1992) Introduction to Animal Parasitology. 3a edição. Cambridge University Press. 549 pp. 38.

Storey DM, Ogbogu VC (1991) Observations on third stage larvae and adults of *Litomosoides carinii* (Nematoda: Filarioidea) by scanning and transmission electron microscopy. *Ann Trop Med Parasitol* 85: 111-121.

Taylor AER (1960) The spermatogenesis and embryology of *Litomosoides carinii* and *Dirofilaria immitis*. *J Helminthol* 34: 3-12.

Taylor MJ (2002) *Wolbachia* endosymbiotic bacteria of filarial nematode. A new insight into disease pathogenesis and control. *Arch Med Res* 33: 422-424.

Taylor MJ, Bandi C, Hoerauf AM, Lazdins J (2000a) *Wolbachia* bacteria of filarial nematodes: a target for control? *Parasitol. Today* 16: 179-180.

Taylor MJ, Cross HF, Bilo K (2000b) Inflammatory responses induced by the filarial nematode *Brugia malayi* are mediated by lipopolysaccharide-like activity from endosymbiotic *Wolbachia* bacteria. *J. Exp. Med.* 191:1429-36.

Taylor MJ, Hoerauf A (1999) *Wolbachia* bacteria of filarial Nematodes. *Parasitol Today* 15: 437-442.

Taylor MJ, Hoerauf A (2001) A new approach to the treatment of filariasis. *Curr Op Infect Dis* 14: 727-731.

Thompson DP, Glary TG (1995) The Structure and Function of Helminth Surfaces. *In: Biochemistry and Molecular Biology of Parasites*. Ed. Marr, J. J. & Müller, M., Academic Press, London, 349 pp.

Tongu Y (1974) Ultrastructural studies of microfilariae of *Brugia malayi*. *Acta Med.*, 28: 219-42.

Vicent AL, Ash LR, Fromes SP (1975) The ultrastructure of adult *Brugia malayi*. *J Parasitol* 61: 499-12.

Walsh JA, Warren KS (1979) Interim strategy for disease control in developing countries. *N Engl J Med* 301: 967-974.

Watson BD (1965) The fine structure of body-wall and the growth of the cuticle in the adult nematode *Ascaris lumbricoides*. *Quarterly Journal of Microbiology Science* 106: 83-91.

Weiner DJ, Soulsby E JL (1982) *Litomosoides carinii*: effect of diethylcarbamazine in microfilaremiias of *Mastomys natalensis* harboring old infections, new infections, and transfused microfilariae. *J Parasitol* 68: 1105-1109.

WHO (World Health Organization), 1994. *Strategies for Control of Lymphatic Filariasis Infection and Disease: Report of a WHO/CTD/TDR Consultative Meeting Health*

at the Universiti Sains Malaysia. Penang: Tropical Disease Research, Control of Tropical Disease, Filariasis

WHO, 1997 a. Lymphatic Filariasis: Reason for Hope. WHO, Geneva.

WHO, 1997 b. Lymphatic Filariasis Elimination. Report of a Meeting of the Principals for the Further Enhancement of Public/ Private Partnership. WHO, Geneva.

WHO, 2000a. Eliminate filariasis: Attack Poverty. *Proceedings of the First Meeting of the Global Alliance to Eliminate Lymphatic Filariasis*. WHO, Geneva.

WHO, 2000b. The Program to Eliminate Lymphatic Filariasis. Training Module on Lymphatic Filariasis for Drug Distribution in Non-Onchocerciasis Co-Endemic Countries, WHO, Geneva.

Williams RW (1948) Studies on the life cycle of *Litomosoides carinii*, filariid parasite of the cotton rat, *Sigmodon hispidus litoralis*. J Parasitol 34: 24-43.

Wright KA (1987) The nematode`s cuticle - Its surface and the epidermis: Function, homology, analogy - A current consensus. J Parasitol 73: 1077-1083.

Wright KA, Hong H (1988) Characterization of the accessory layer of the cuticle of muscle larvae of *Trichinella spiralis*. J Parasitol 74: 440-451.

Wynd S, Melrose WD, Durrheim DN, Carron J, Gyapong M. (2007) Understanding the community impact of lymphatic filariasis: a review of the sociocultural literature. Bull World Health Organ 85: 493-8.

Zintz K, Frank W (1982) Ultrastructural modifications in *Heterakis spumosa* after treatment with febantel or mebendazole. Vet Parasitol 10(1): 47-56

Zuckerman MB, Kahane I, Himmelhock S (1979) *Caenorhabditis briggsae* and *Caenorhabditis elegans*: partial characterization of cuticle surface carbohydrates. Exp Parasitol 47: 419-424.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)