



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Ludmila Rocha Lima

**Caracterização morfológica, ultraestrutural e modelagem 3D de ovos
embrionados de *Trichuris muris***

Rio de Janeiro

2019

Ludmila Rocha Lima

**Caracterização morfológica, ultraestrutural e modelagem 3D de ovos embrionados
de *Trichuris muris***

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de Concentração: Microbiologia Médica Humana.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo José Lopes Torres

Rio de Janeiro

2019

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

L732 Lima, Ludmila Rocha.

Caracterização morfológica, ultraestrutural e modelagem 3D de ovos embrionados de *Trichuris muris* / Ludmila Rocha Lima. - 2019.
60f.

Orientador: Eduardo José Lopes Torres.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Microbiologia.

1. Helminto - Teses. 2. Parasitismo - Teses. 3. Tricuríase. 4. Nematoides. I. Torres, Eduardo José Lopes. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

CDU 595.1

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira
CRB7/6382

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Ludmila Rocha Lima

**Caracterização morfológica, ultraestrutural e modelagem 3D de ovos embrionados
de *Trichuris muris***

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de Concentração: Microbiologia Médica Humana.

Aprovada em 3 de maio de 2019.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo José Lopes Torres
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Renata Heisler Neves

Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Prof.^a Dra. Cintia Silva dos Santos

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof. Dr. Wendell Girard-Dias

Fundação Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro

2019

Dedico este trabalho a Valdete Rocha, minha avó, que foi extremamente importante na minha vida. Me mostrando princípios básicos para que eu conseguisse conquistar tudo que me fosse permitido. Por sempre estar à disposição em todos os momentos em que precisei de um consolo ou simplesmente para “tomar aquela prosa” no final da tarde, como ela mesma dizia.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha vó, por me mostrar que eu poderia ser forte mesmo quando não acreditava mais em mim;

Aos meus familiares por me ajudarem a traçar meu caminho, me dando aconchego e alegrias;

Ao meu sobrinho Bernardo, que me mostrou como tenho que ser forte para ajuda-lo,

À minha prima, Amanda por ser desde sempre essa irmã na minha vida;

Ao vô Coutinho, por todo conhecimento dado, carinho e conselhos quando mais precisei e por me mostrar o verdadeiro valor do conhecimento e da dedicação a comunidade;

Ao meu orientador, instrutor e grande amigo Eduardo Torres, pelos “puxões de orelha”, por me apoiar sempre, por ser meu pai científico e por acreditar no meu potencial;

Aos meus colegas de laboratório, Dayane Alvarino, Makoto Enoki, Alessandra Campos, Ander Castello, Ana Paula Brito, Yan Dias por toda ajuda fornecida durante todo processo de formação deste trabalho;

Aos integrantes do Departamento de Parasitologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, por todas risadas, ajudas durante algum experimento, palavras de consolo;

Ao grupo Pós Helminto, por se mostrarem verdadeiros amigos que sempre ansiaram pelas minhas vitórias;

Aos meus amigos, que mesmo sem entender meus desesperos me trouxeram alegria a todos momentos;

Às organizações de fomento: CAPES, FAPERJ, CNPQ, pelo apoio financeiro durante todo período em que realizei meus experimentos;

Ao apoio de toda a equipe de docentes e técnicos das plataformas de microscopia da UFRJ, o Centro Nacional de Biologia Estrutural e Bioimagem (CENABIO) e da Fiocruz, a Plataforma de Microscopia Eletrônica Rudolf Barth.

No dia de horror, na noite homicida,
Com o coração aquecido minha alma ilumina
Quando a Guerra da Luz parecer perdida,
A esperança brilha nas estrelas acima!

Blackest Night – DC Comics

RESUMO

LIMA, Ludmila Rocha. **Caracterização ultraestrutural do ovo embrionado e da larva L1 de *Trichuris muris***. 2019. 60 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019

As geo-helmintoses são doenças negligenciadas desenvolvidas por nematoides que dependem do solo para o seu desenvolvimento completo. Segundo dados da OMS, estima-se que 1,5 bilhões de pessoas estejam infectadas por geo-helmintos no mundo. São doenças associadas a questões sociais e climáticas, afetando principalmente crianças em idade escolar. Dados do último Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose mansoni e Geo-helmintoses, mostram uma proporção de 5,41% de positividade para tricuriase no país. A tricuriase é uma parasitose que atinge diversos mamíferos, possuindo impacto na medicina humana e veterinária. A espécie *Trichuris muris* é utilizada como modelo experimental para a tricuriase, onde seu ciclo se inicia com a ingestão de ovos embrionados pelo seu hospedeiro. Esse ovo possui três camadas visíveis por microscopia de luz. Este trabalho possui como enfoque objetivo caracterizar a ultraestrutura da casca de ovos embrionados e da larva L1 de *Trichuris muris* fixados por congelamento e submetidos a substituição à frio. Foram utilizados como métodos de preparação das amostras a fixação química convencional e a fixação física por congelamento por alta pressão seguido de substituição a frio. O material fixado quimicamente foi marcado com calceína e DAPI e analisado por microscopia de fluorescência, confocal e de alta resolução. Nos resultados obtidos por microscopia de luz (ML) foi possível visualizar as três camadas da casca compondo o ovo trilaminar (camada vitelínica, camada de quitina e camada lipídica). Foi possível identificar o esôfago na região anterior e células germinativas mais concentradas na região posterior da larva. Com base na microscopia de fluorescência, a calceína apresentou alta afinidade pela casca e pelo plugue polar, e a marcação com o DAPI permitiu a caracterização das células da larva L1. Através da série de imagens obtidas por confocal, foi realizada a reconstrução e modelagem das células germinativas, possibilitando a contagem das mesmas, totalizando 151 células em média por larva. Por MET, foi possível caracterizar as subcamadas da casca do ovo, mostrando que a camada vitelínica se apresenta como uma fina camada externa, enquanto a camada de quitina possui uma estrutura densa. A camada lipídica, mais interna, apresenta alta eletrondensidade, linear por toda extensão do ovo, totalizando um conjunto de 14 subcamadas. Os plugues apresentam-se como uma continuação da camada de quitina, entretanto com uma conformação distinta, além de se apresentarem mais internamente. Conclui-se que a fixação física e o uso das diferentes técnicas de microscopia foram importantes para caracterizar em detalhes a morfologia e morfometria das diferentes camadas da casca do ovo, além da caracterização de detalhes estruturais, morfológicos e das células germinativas presentes na larva L1 no interior dos ovos de *T. muris*.

Palavras-chaves: Geo-helmintoses. *Trichuris muris*. MET. Ovo. Confocal. 3D

ABSTRACT

LIMA, Ludmila Rocha. **Ultrastructural characterization of the embryonic egg and the L1 larva of *Trichuris muris***. 2019. 60 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

Soil-transmitted helminthiasis are neglected diseases developed by nematodes that depend on the soil for their complete development. According to WHO data (2018), it is estimated that in the world, 1.5 billion people are infected by soil-transmitted helminths. These are diseases associated with social and climatic characteristics, mainly affecting school-age children. Data from the last national prevalence inquiry of schistosomiasis and Soil-transmitted helminthiasis show a proportion of 5.41% positivity for trichuriasis in Brazil. Trichuriasis is a parasitosis that affects several mammals, having an impact on human and veterinary medicine. The species *Trichuris muris* is used as an experimental model for trichuriasis, the life cycle begins with the ingestion of embryonated eggs by the host. This egg presents three layers identified by light microscopy. The aim of this work is the ultrastructural characterization of the embryonated egg and the L1 larva of *Trichuris muris* fixed by high-pressure freezing followed by freeze-substitution and analyzed by electron microscopy. Chemically fixed samples were stained with calcein and DAPI for fluorescence microscopy, confocal and super-resolution microscopy resolution experiments. The results obtained by light microscopy (LM) showed the three layers forming the trilaminar egg shell (vitelline, chitin and lipid layers). The larva esophagus and germ cells concentrated in the posterior region of the larva was also observed. Based on fluorescence microscopy, the Calcein showed high affinity for the eggshell and of the polar plug, while DAPI allowed the characterization of the L1 larvae cells. Through the series of images obtained by confocal, we performed the reconstruction and modeling of the germ cells, which allowed to count 151 cells on average per larvae. Using TEM, it was possible to characterize the sublayers of the eggshell, showing that the vitelline layer is present as a thin outer layer, while the chitin layer is a dense structure. Lipid layer is the most internal and presents high electron density, linear for the entire length of the egg, with 14 sublayers. The plugs are present as a continuation of the chitin layer, with a distinct conformation, besides presenting more internally. It was concluded that the physical fixation and the use of the different microscopy techniques were important to characterize in detail the morphology and morphometry of the different layers of the eggshell, besides of the characterization of the structural and morphological details, and the germ cells in the L1 larva inside of the *T. muris* eggs.

Keywords: Soil-transmitted helminth. *Trichuris muris*. TEM. Egg. Confocal. 3D

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Macho e fêmea de um nematoide.....	13
Figura 2 -	Proporção de crianças (1 - 14 anos de idade) nos países que requerem quimioterapia preventiva para helmintíase transmitida pelo solo.....	15
Figura 3 -	Distribuição da tricuriase no Brasil 2010/2015.....	16
Figura 4 -	Morfologia de um macho e uma fêmea de <i>Trichuris muris</i>	17
Figura 5 -	Morfologia interna de uma fêmea (a) e um macho (b) de <i>Trichuris trichiura</i>	18
Figura 6 -	Ciclo biológico de <i>Trichuris trichiura</i>	19
Figura 7 -	Casca externa trilaminar do ovo de <i>C. elegans</i>	21
Figura 8 -	Casca dos ovos de nematoides.....	22
Figura 9 -	Formação das camadas da casca do ovo de <i>Trichuris muris</i>	23
Figura 10 -	Fixação da região anterior de <i>Trichuris muris</i> no lúmen do intestino.....	25
Figura 11 -	Ovos de <i>Trichuris muris</i>	35
Figura 12 -	Ovos embrionado de <i>T. muris</i> marcados com fluorescência.....	36
Figura 13 -	Ovos de <i>T. muris</i> por microscopia confocal e alta resolução.....	38
Figura 14 -	Série de imagens no ovo de <i>T. muris</i> por alta resolução.....	39
Figura 15 -	Reconstrução 3D dos ovos embrionados de <i>T. muris</i>	40
Figura 16 -	Reconstrução 3D do ovo não embrionado de <i>T. muris</i>	41
Figura 17 -	Células formadoras da larva de <i>T. muris</i>	44
Figura 18 -	Plugue polar do ovo embrionado de <i>T. muris</i> por MET.....	45
Figura 19 -	Casca do ovo embrionado de <i>T. muris</i> por MET.....	46
Figura 20 -	Ovo embrionado de <i>T. muris</i> por MET.....	47
Figura 21 -	Detalhes da larva de <i>T. muris</i> por MET.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Bb	Banda bacilar
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DNA	Ácido desoxirribonucleico
CC	Camada de cutícula
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CG	Células germinativas
CL	Camada lipídica
CV	Camada vitelínica
DIC	<i>Differential interference contrast</i>
Es	Esôfago
FCM/UERJ	Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro
INPEG	Inquerito Nacional de Prevalencia da Esquistossomose mansoni e Geo-helminthoses
ML	Microscopia de luz
MEE	Matriz Extra- embrionária
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
OPAS	Organização Pan-americana da Saúde
OMS	Organização Mundial da Saúde
oo	Oolema
OP	Opérculo
pH	Potencial Hidrogeniônico
RA	Região anterior
RP	Região posterior
Th	Linfócito <i>T helper</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
®	Marca registrada
±	Mais ou menos
µm	Micrometro
nm	Nanometro

SUMÁRIO

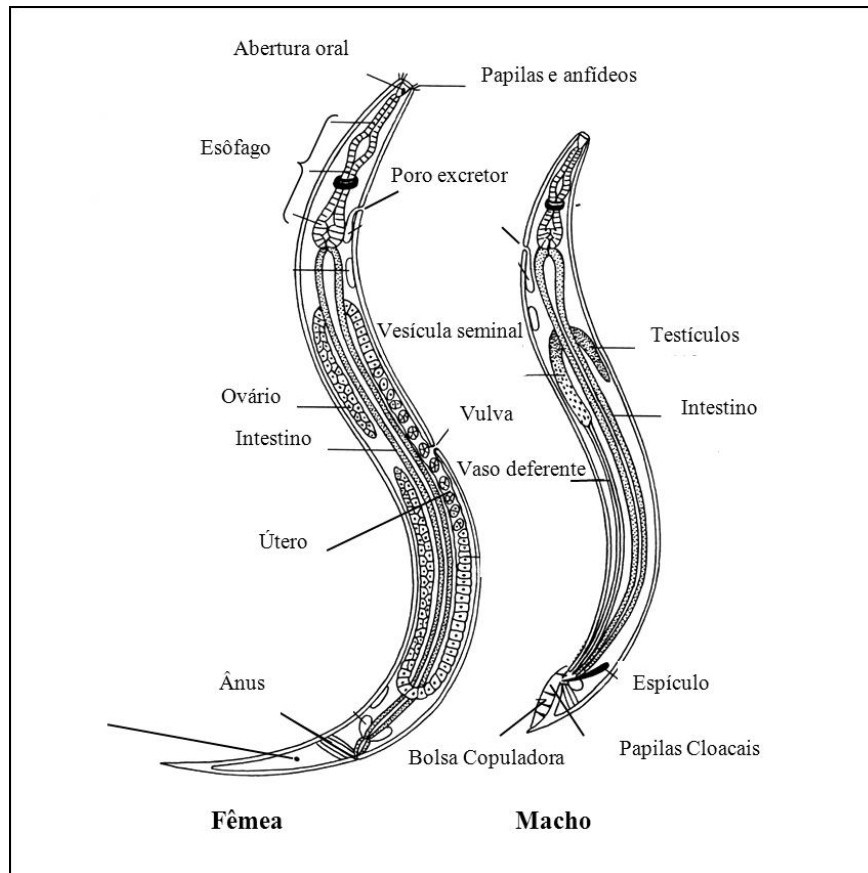
	INTRODUÇÃO	12
1	OBJETIVOS	29
1.1	Geral	29
1.2	Específicos	29
2	MATERIAL E MÉTODOS	30
2.1	Recuperação de ovos	30
2.2	Microscopia de luz (campo claro e DIC)	30
2.3	Microscopia de fluorescência e confocal	31
2.4	Reconstrução e modelagem 3D	31
2.5	Fixação física por congelamento por alta pressão e substituição à frio	32
2.6	Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	32
2.7	Análise estatística	33
3	RESULTADOS	34
3.1	Caracterização morfológica dos ovos embrionados de <i>Trichuris muris</i> e modelagem 3D	34
3.2	Caracterização ultraestrutural da casca do ovo e da larva de <i>Trichuris muris</i>	42
4	DISCUSSÃO	49
	CONCLUSÕES	56
	REFERÊNCIAS	57

INTRODUÇÃO

O grupo dos helmintos é composto por organismos vulgarmente conhecidos por vermes e são representantes dos Filos Nematoda, que são cilíndricos; Platyhelminthes que são achatados e Acanthocephala, que possuem ganchos na região anterior (NEVES, 2005). Estes organismos habitam o planeta há milhares de anos, havendo registros fósseis datados em até 5.000 anos, sendo possivelmente trazidos junto as migrações humanas vindas da Oceania (REY, 2011). Podem ser encontrados em vida livre, ocupando ambientes terrestres e aquáticos ou parasitando diversos tipos de tecidos em hospedeiros de diferentes táxons, incluindo vegetais e animais invertebrados e vertebrados.

Os nematoides possuem algumas características específicas que os diferem dos outros helmintos, são elas: corpo cilíndrico, recoberto por uma matriz extracelular (cutícula), hipoderme e musculatura, formando a parede do corpo. As extremidades são afiladas, tem simetria bilateral e são pseudocelomados. Além disso, esses organismos são protostomados, com sistema digestório completo provido de cápsula bucal diferenciada, esôfago glandular dividido em três segmentos: corpo, istimo e bulbo. Majoritariamente dioicos na extremidade anterior encontra-se o anel nervoso, poro excretor e nas fêmeas, a vulva pode ser anterior, média ou posterior. Na porção terminal das fêmeas apresenta-se o ânus e nos machos identifica-se uma cloaca e espículo (simples ou duplo) (Figura 1) (SCHIMIDT; ROBERTS, 2005)

Figura 1 - Esquema representativo de macho e fêmea de um nematoide



Fonte: Adaptado SCHMIDT E ROBERTS, 2005

As geo-helmintíases são doenças negligenciadas desenvolvidas por nematoides que durante seu ciclo de vida necessitam do solo quente e úmido para o amadurecimento das formas infectantes (BROOKER; CLEMENTS; BUNDY, 2006; ROCHA et al., 2011; MONTEIRO et al., 2018). Estas parasitoses têm como principais sintomas anemia, diarreia, dor abdominal e comprometimento do desenvolvimento cognitivo (COURA, 2005; REY, 2011).

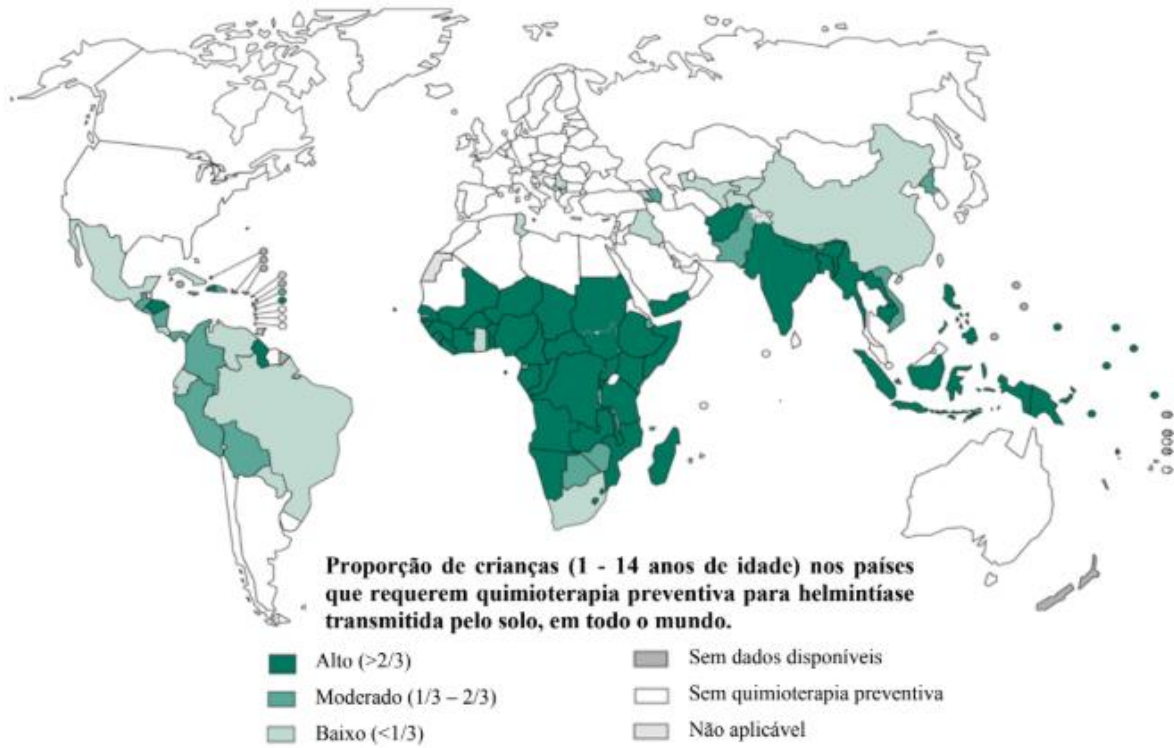
Os geohelminhos de transmissão passiva possuem como forma de infecção ovos embrionados, que precisam ser ingeridos pelos hospedeiros susceptíveis à infecção. Os ovos são estruturas de resistência, que associam a dispersão do parasito com a manutenção da viabilidade infectiva. Mesmo em condições de estresse ambiental, como: amplitude térmica, variação na umidade, ações mecânicas e agressão de microrganismos ambientais (fungos e bactérias), esses ovos resistem e se mantêm viáveis no ambiente por muitos anos (LÝSEK; MALÍNSKÝ; JANISCH, 1985). Porém, da mesma forma que promovem resistência, permitem a troca de informações físico-químicas com o meio influenciando na taxa e

velocidade de embrionamento das larvas em relação à variação da temperatura. Além disso, essa complexidade funcional dos ovos também confere ao parasito resistência à acidez estomacal e a ação de enzimas digestivas após ser ingerido pelo hospedeiro vertebrado, bem como permite que a larva seja sensibilizada e detecte o momento certo para eclodir e estabelecer a infecção. Vale destacar que os plugues polares, estruturas presentes nos polos dos ovos de nematoides tricurídeos podem sofrer ação de microrganismos presentes no hospedeiro para facilitar a eclosão da larva (L1) que sai, eclode por essa região do ovo e estabelece o primeiro contato com o tecido hospedeiro, isso foi mostrado em infecção experimental de *Trichuris muris* em camundongos (KLEMENTOWICZ, TRAVIS, GRENCIS; 2012).

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) estima-se que há 1,5 bilhões de pessoas infectadas por geo-helminhos, equivalendo a 24% da população mundial (WHO, 2018). Parte significativa dessa população são crianças residentes de países da África subsaariana, Américas, China e do leste da Ásia. São doenças associadas a questões sociais, somadas à características climáticas de zonas tropicais e subtropicais (Figura 2) (WHO, 2018). Cerca de 267 milhões dessas crianças estão em idade pré-escolar e mais de 568 milhões em idade escolar, impactando diretamente no retardo do crescimento físico e cognitivo, se desdobrando em déficit de aprendizagem e aumentando a desigualdade social (HOTEZ et al., 2008; BROOKER, 2010; ROCHA et al., 2011). Os casos mais graves dessas infecções ocorrem em regiões com alta taxa de pobreza e as medidas de controle dependem de estrutura básica de saneamento, principalmente tratamento de esgoto e fácil acesso a medicação anti-helmíntica.

Como destacado, as crianças são as principais vítimas, e segundo a Organização Pan-americana de Saúde (OPAS), no ano de 2017, em 25 países da América Latina e Caribe havia 46 milhões de crianças em zonas de risco elevado de infecção ou reinfecção por geohelminhos e só em 2013 os registros mostram que cerca de 20 milhões de crianças foram tratadas para infecções provocadas por geo-helminhos (OPAS, 2016). No Brasil, o último inquérito epidemiológico mostra que as geo-helminthiases têm diminuído significativamente em regiões anteriormente consideradas como focos importantes dessas doenças (KATZ, 2018), porém devido ao mal funcionamento do tratamento de esgoto associado ao baixo índice de escolaridade da população brasileira, as infecções por geo-helminhos ainda se mostram como um problema latente de saúde pública (KATZ, 2018). Vale destacar que, em nosso país, as áreas mais afetadas continuam sendo as zonas rurais e periferias dos centros urbanos, onde os problemas socioeconômicos e estruturais são mais evidentes.

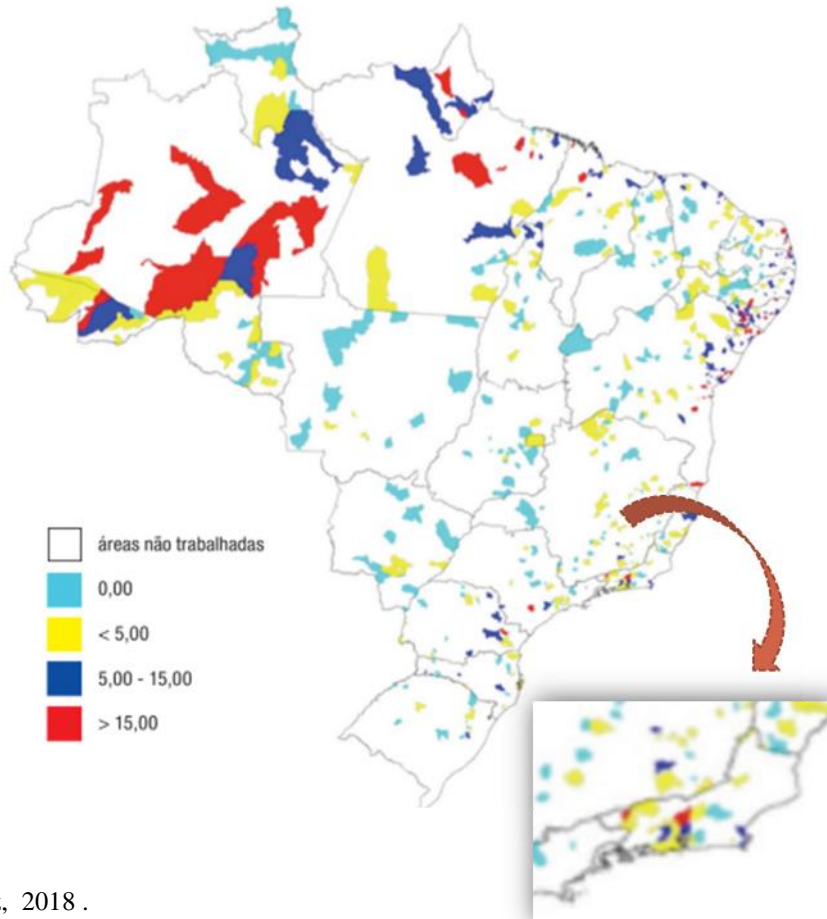
Figura 2 - Proporção de crianças (1 - 14 anos de idade) nos países que requerem quimioterapia preventiva para helmintíase transmitida pelo solo



Fonte: Adaptada de WHO, 2015

Dados do Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose mansoni e Geohelmintoses de 2018, mostram que a proporção de positividade para tricuriíase no país chega em torno de 5,41%, sendo a maior proporção equivalente a região norte e nordeste do país. Referente a região sudeste, aonde se concentram as maiores metrópoles do país, consta que 90% dos casos positivos se encontram no Rio de Janeiro. Desses valores, as maiores concentrações são na região serrana, mais especificamente em Petrópolis (19%) e no interior do estado, sendo 21% no município Quatis (Figura 3) (KATZ, 2018).

Figura 3 - Distribuição da tricuriíase no Brasil 2010/2015, em detalhe o Estado do Rio de Janeiro



Fonte: Katz, 2018 .

Gênero *Trichuris*

Nematoides tricuriídeos tem como representantes diversas espécies do gênero *Trichuris* com responsáveis por desenvolver a tricuriíase humana e veterinária, podendo também receber o nome tricurose ou tricocefalose. A espécie *T. trichiura* (Owen, 1835) é responsável pela infecção em humanos, e as de importância veterinária, são: *Trichuris vulpis* (Froelich, 1789), que parasita de cães (DUNN et al., 2002); *T. suis* (Schrank, 1788), parasito de suínos; *T. ovis* (Abildgaard, 1795), parasito de bovinos e caprinos (PATRA et al., 2015); e *T. muris* que é o parasito de camundongos e amplamente usado como modelo experimental (KLEMENTOWICZ; TRAVIS; GRENCIS, 2012). Além disso, há diversas espécies parasitando animais silvestres, como por exemplo a espécie descrita pelo nosso grupo, o *T. thrichomysi* (LOPES-TORRES et al., 2011), parasito dos roedores silvestres *Thrichomys apereoides* e *Thrichomys pachiurus*.

Os membros deste gênero apresentam o corpo filiforme (mais delgado) na região anterior compreendendo $2/3$ do corpo do parasito e fusiforme (mais robusto) na região posterior representando $1/3$ do corpo (Figura 4). As fêmeas possuem de 3 a 5 cm de comprimento e os machos são menores com a ponta da região posterior enrolada ventralmente. Seu corpo é recoberto por uma cutícula estriada transversalmente, exceto na região dorsoventral da parte afilada do corpo, onde se encontra a banda bacilar. Os órgãos bucais são muito simples e sem estruturas de fixação, o esôfago é envolvido por várias células chamadas de esticócitos, formando em conjunto o esticossomo (ROBERTS, 2004). A cutícula é lisa apresentando poros cuticulares na região anterior, onde encontra-se a banda bacilar, formada pelos esticócitos (internamente), glândulas bacilares e inflações cuticulares (LOPES-TORRES, 2011). O intestino e órgãos reprodutores se organizam na parte posterior e mais robusta do corpo. Nas fêmeas, a vulva que se encontra próxima da transição da região anterior com a região posterior; enquanto nos machos um espiculo único que pode ser observado coberto pela bainha espicular na extremidade posterior, o mesmo pode apresentar espinhos ou não. As fêmeas apresentam útero monodelfico e opistodelfico, por possuírem somente um ovário que se encontra posicionado depois da vulva. São classificados como ovíparos. As fêmeas possuem anus enquanto os machos possuem cloaca. Os caracteres morfológicos e morfométricos das estruturas genitais são fundamentais para a identificação das espécies deste grupo (Figura 5) (SCHIMIDT, 2004).

Figura 4 - Morfologia de um macho e uma fêmea de *Trichuris muris*

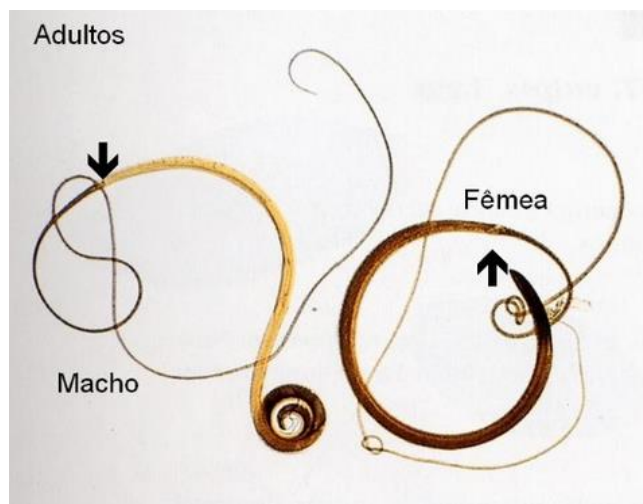
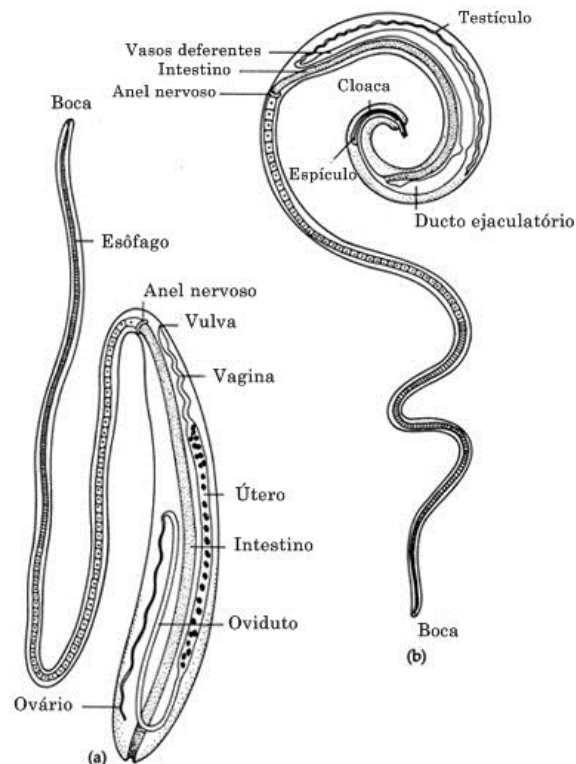


Figura 5 - Morfologia interna de uma fêmea (a) e um macho (b) de *Trichuris trichiura*



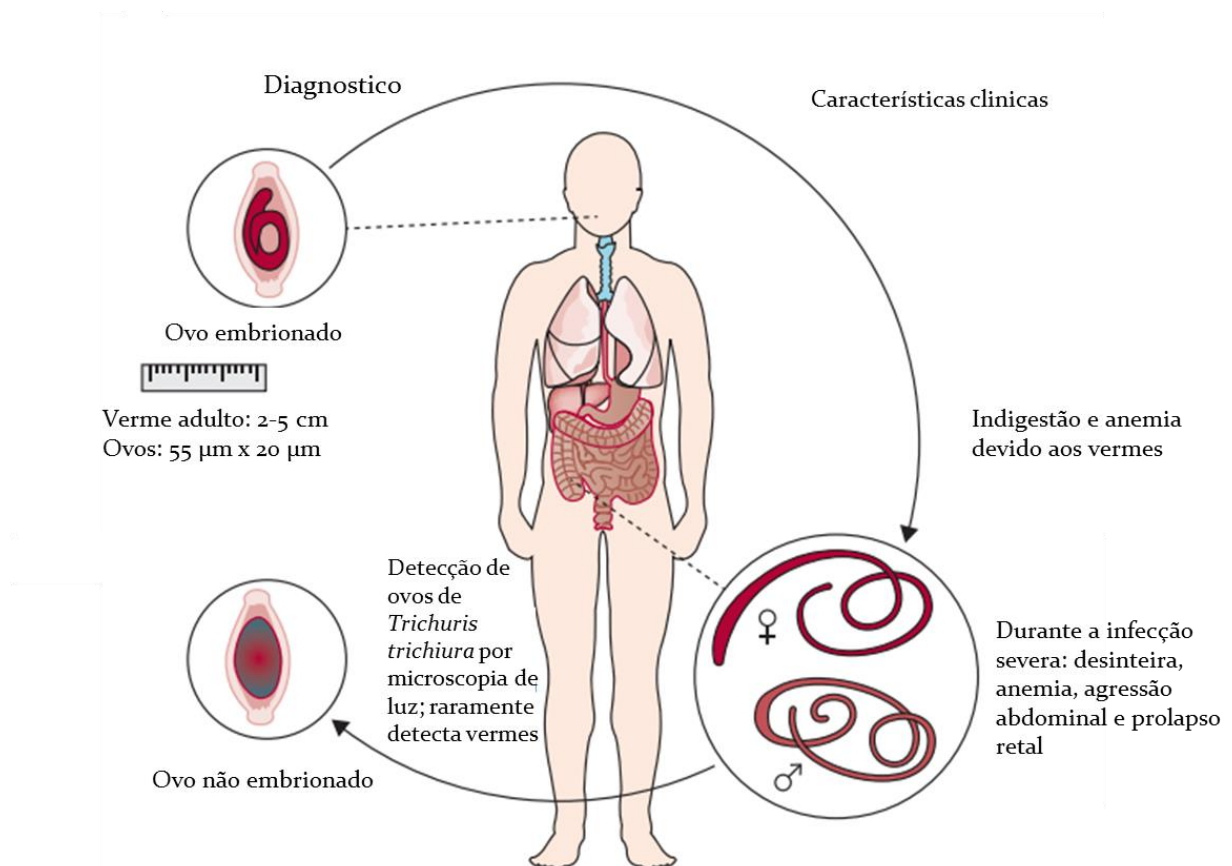
Fonte: Adaptado de SCHMIDT e ROBERTS, 1996

Ciclo de vida

Trichuris spp. são parasitos que estabelecem a infecção em hospedeiros mamíferos de forma semelhante (JOURDAN et al., 2018). Durante a infecção, a fêmea libera seus ovos junto às fezes do hospedeiro. Esses ovos chegam ao ambiente sem a capacidade de infectar, pois não há uma larva formada no seu interior. Após o contato com um solo quente e úmido, o mesmo encontra condições ambientais favoráveis para que haja o desenvolvimento da larva L1 no seu interior, gerando assim o ovo embrionado. O ciclo continua quando ovos embrionados são ingeridos por hospedeiros susceptíveis, isso pode ocorrer através de alimento contaminado com solo e/ou mãos não higienizados corretamente, ou ao entrar em contato com fômites contaminadas. Em seguida, os ovos sofrem ação das enzimas gástricas, suportando as alterações de pH e ação da microbiota local. Logo, ocorre a eclosão da larva L1, através de um dos opérculos polares. A larva L1 então se direciona a região do intestino, ceco, se inserindo nas criptas de Lieberkuhn, penetrando assim através das células

caliciformes. Essas larvas se desenvolvem neste local, sofrendo mudas e chegando a fase adulta. A primeira muda ocorre depois de 9 a 11 dias, gerando uma larva L2; logo em seguida ocorre a segunda muda, em um período de 13 dias, formando uma larva L3. Após 22 dias é realizada a terceira muda e 32 dias após a infecção então ocorre a quarta e última muda, iniciando o seu crescimento e amadurecimento sexual, aumentando a espessura da região posterior. Por este motivo, a região posterior rompe a superfície do tecido intestinal e vai para a luz, mantendo a sua região anterior inserida no epitélio da mucosa intestinal. Com as porções posteriores livres na luz intestinal, ocorre a cópula e então a liberação de mais ovos pelas fêmeas, eliminados junto as fezes e o ciclo continua(Figura 6) (KLEMENTOWICZ; TRAVIS; GRENCIS, 2012). Em *T. muris* há uma estimativa da eliminação de 7500 a 7900 ovos por fêmea (PIKE, 1969).

Figura 6 - Ciclo biológico de *Trichuris trichiura*



Fonte: Adaptado JOURDAN et al., 2018

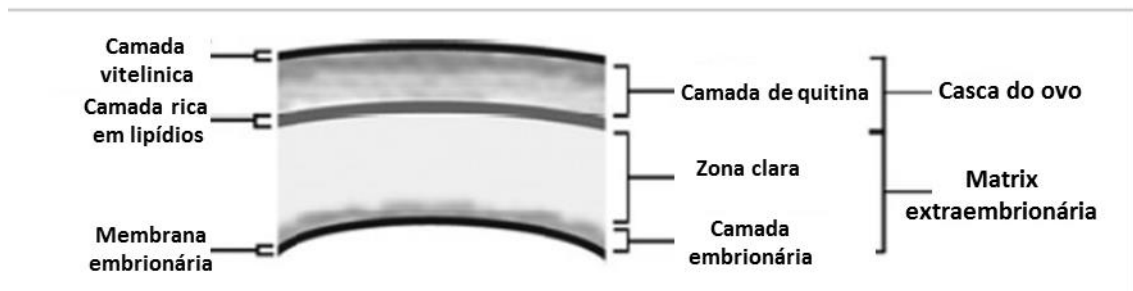
Ovo de nematoides

Ainda no útero das fêmeas, durante o processo de formação da casca, inicialmente o ovo é revestido por uma camada definida como oolema (oo), que é a diferenciação da zona pelúcida logo após a fecundação, momento em que se forma um conjunto de células pouco diferenciadas (mórula). Em seguida a zona vitelínica é produzida acima do oolema, sendo que essa formação pode ocorrer imediatamente após a fecundação ou um período posterior, sendo este não informado na literatura. Posteriormente a este processo ocorre a formação da blástula e da blastocele, que é uma cavidade preenchida com secreções celulares e com uma alta concentração de proteínas que são formadas durante o amadurecimento da mórula para blástula. Logo em seguida inicia-se a formação da gástrula e o espaço pré-vitelínico. Neste momento encontra-se um grande número de retículos endoplasmáticos rugosos e há uma intensa liberação de vesículas proteicas pelo complexo de Golgi, que vão atuar secretando proteínas insolúveis direcionadas para a região que se forma logo após do oolema do embrião, iniciando a formação da camada de quitina do ovo. Na região central do embrião se encontra o vitelo e vesículas ricas em lipídeos são direcionados para a região de formação da casca, formando a camada lipídica interna. Ao término deste processo as três camadas majoritárias são formadas, o conjunto destas camadas é denominado : casca externa trilaminar, e já podem ser distinguidas por microscopia de luz: camada lipídica externa denominada camada vitelínica, camada densa e proteica denominada camada de quitina, e camada próxima ao oolema, que também é composta por proteoglicanos de condroitina (Figura 7) (PRESTON; JENKINS, 1985; STEIN; GOLDEN, 2018).

A camada vitelínica foi melhor explorada em ovos de *Ascaris lumbricoides* (FOOR, 1967; STEIN; GOLDEN, 2018); esta camada que já se encontra desde o oócito, antes mesmo da fecundação, mantendo-se após a fertilização até a eliminação para o ambiente externo. Durante o processo de embrionamento essa camada tem sido associada a membrana plasmática do oócito, entretanto alguns autores sugerem que quando há a fertilização a camada vitelínica se separa da membrana do oócito formando uma outra estrutura (HALL; ALTUN, 2008). Essa estrutura pode ser retirada com tratamento com hipoclorito de sódio, sem que seja prejudicado o desenvolvimento do embrião. A camada seguinte é formada por quitina e só pode ser removida com a ação de enzimas quitinase (WHARTON, 1980; EDGAR, 1995). Após a remoção da camada de quitina o ovo perde a sua forma ovoide, mostrando que é esta camada que tem os componentes estruturais que garantem o suporte mecânico do ovo. Mesmo sendo considerada uma estrutura rígida e de suporte, a camada de

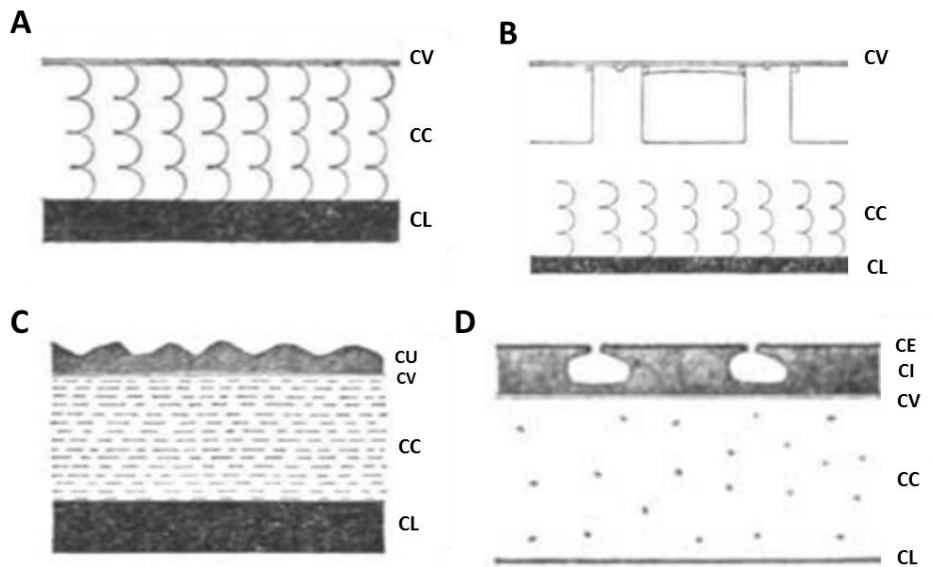
quitina é formada por uma estrutura em malha ou esponjosa (STEIN; GOLDEN, 2018). A quitina que compõe esta camada é sintetizada e depositada na casca do ovo antes do zigoto sair da espermateca (JOHNSTON; KRIZUS; DENNIS, 2010). A camada mais interna, a de proteoglicano de condroitina foi caracterizada por mais de 100 anos como sendo rica em lipídios e estudos mais recentes realizaram a extração química sustentaram estes resultados (CHITWOOD; CHITWOOD, 1950; STEIN; GOLDEN, 2018). Estudos mais recentes em *C. elegans* mostraram que essa região também é caracterizada pela presença de dois proteoglicanos sendo eles o CPG/CEJ-1 e CPG-2, levando alguns autores a renomearem a anteriormente conhecida como camada lipídica por camada de proteoglicano (OLSON et al., 2012), entretanto, a denominação anterior (camada lipídica) ainda se encontra consolidada na literatura.

Figura 7 - Casca externa trilaminar do ovo de *Caenorhabditis elegans*



Fonte: JOHNSTON; DENNIS, 2012

Figura 8 - Casca dos ovos de nematoides



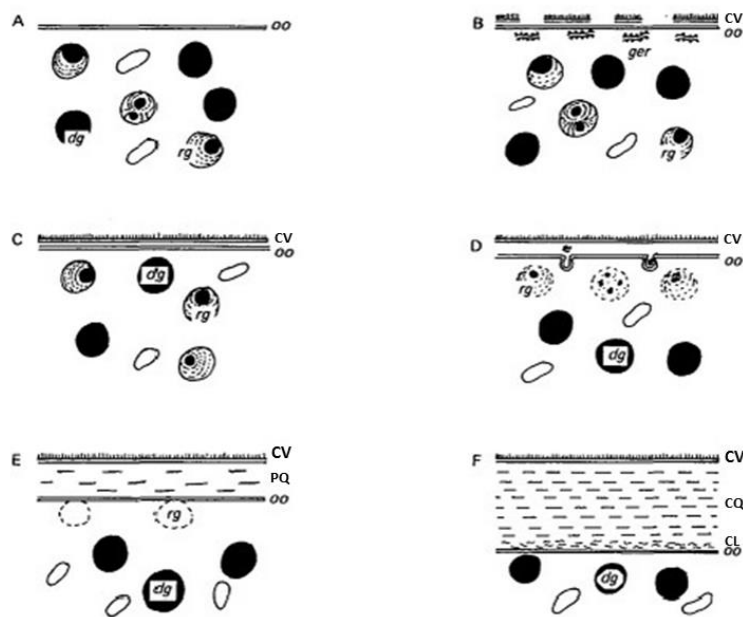
Legenda: A- *Trichuris suis*, B – *Capillaria hepatica* , C – *Ascaris lumbricoides*, D – Oxiurídeos, Camada vitelínica (CV), Camada cuticular (CC), Camada lipídica (CL), Camada uterina (CU), Camada externa do útero (CE), Camada interna do útero (CI) .

Fonte: Adaptado de WHARTON, 1980

Pelo fato de cada espécie possuir especificidades em relação ao desenvolvimento dos ovos, passando por ciclos diferentes, isso imprime características únicas de conformação nos táxons, sendo possível utilizar na identificação de espécies, gêneros, etc. Wharton, em 1980 listou alguns nematoides de acordo com as características das camadas da casca dos seus ovos. Para *T. suis*, demonstrou que a camada de quitina se apresenta como uma camada helicoidal, mantendo a camada de vitelínica e lipídica similar referente a sua composição a maioria dos nematódeos (Figura 8A). Para *Capillaria hepatica*, a casca é marcada por uma camada cuticular que se apresenta em forma de vigas e colunas, além da forma helicoidal, revelando ser uma camada alongada (Figura 8B). Em *A. lumbricoides*, encontra-se uma camada externa à camada vitelínica, chamada de camada uterina, que é formada por mucopolissacarídeo e apresenta ondulações (sinuosa) que são responsáveis pela aparência mamilonada da superfície, que é uma característica marcante desses ovos (Figura 8C). Em estudos realizados em 1979, Wharton demonstrou que, em oxiurídeos, além da camada vitelínica, existem duas outras externas, denominadas de camada externa do útero e interna do útero, formando reentrâncias, logo depois as três camadas que são comuns ao Filo; neste grupo a camada de quitina se mostra mais difusa (Figura 8D).

O ovo de *Trichuris* possui forma alongada e quando coletado em amostras de fezes apresenta a cor acastanhada. Medem de 60 a 70 micrômetros (μm) de comprimento e de 37 a 40 μm de largura. A casca possui cerca de 4 μm de espessura e é provida de dois tampões mucoides chamados de plugues polares com espessura de 4 μm (PRESTON E JENKINS, 1985, INATOMI, 1960). Por microscopia de luz é possível diferenciar três camadas majoritárias, que por microscopia eletrônica de transmissão (MET) foram subdivididas em subcamadas que se diferenciam em espessura, número de camadas e eletrondensidade durante a formação do ovo, imediatamente após a entrada do espermatozoide no oócito (PRESTON; JENKINS, 1984).

Figura 9 - Formação das camadas da casca do ovo de *Trichuris muris*



Legenda: A- Aproximação dos grânulos lipídicos na membrana do oolema (oo); B- Deposição dos grânulos lipídicos que atravessam o oolema formando a camada vitelínica (CV); C- A diferenciação das camadas vitelínica e oolema; D – Deposição do conteúdo de grânulos proteicos entre o oolema e a camada vitelínica; E- Deposição de grânulos contínuos e o início da formação da camada de quitina (PQ); F- Deposição de grânulos lipídicos formando a camada lipídica (CL) finalizando a formação das três camadas majoritárias do ovo de *T. muris*.

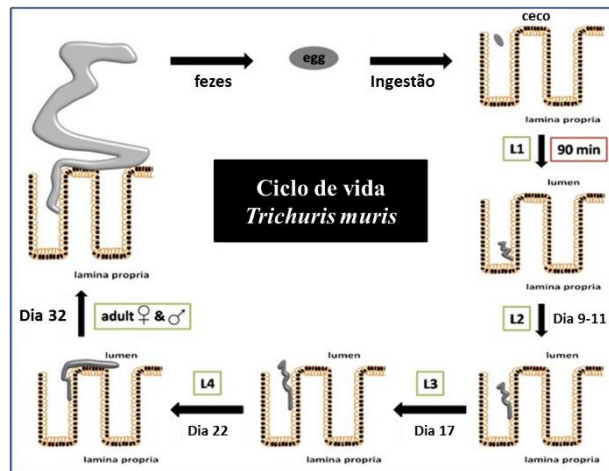
Fonte: PRESTON; JENKINS, 1984

Preston e Jenkins, 1984 caracterizaram a formação da casca do ovo de *T. muris* e demonstraram que rosetas de glicogênio e lipídios, liberadas pelo óvulo após a fecundação, alimentariam a periferia do zigoto com esses compostos químicos e formariam a casca, ou seja, a casca seria uma derivação do oolema após modificações químicas que aconteceriam após a fecundação. Neste mesmo trabalho, os autores observaram a presença de ribossomos

entre as camadas da casca e sugeriram que estas organelas seriam responsáveis por liberar proteínas que auxiliariam na formação das diferentes camadas. No ano seguinte, em 1985, os mesmos autores estudaram mais especificamente os plugues polares e mostraram que esta região tem uma composição diferenciada quando comparada com a parte majoritária da casca. Utilizando a MET mostraram que grânulos de glicogênio e inclusões lipídicas, que comumente são encontradas na casca dos ovos, não estavam presentes na região dos plugues, deixando esta região menos eletrondensa e mais difusa (PRESTON e JENKINS, 1985). Em 1978, Wharton menciona que o opérculo é formado por um complexo de quitina em estrutura helicoidal, porém com um arranjo diferente da camada quitinosa da casca. Sugerem que essa conformação, permite que seja uma região mais suscetível a degradação facilitando a saída da larva no momento da eclosão (Figura 9) (WHARTON; JENKINS, 1978)

Os ovos, que geralmente são caracterizados como estruturas inertes, possuem uma íntima relação biológica com o hospedeiro e sua microbiota. Após serem ingeridos, bactérias da microbiota intestinal interagem com os plugues polares, gerando uma desestabilização das fibras proteicas, que compõe esta região, facilitando a eclosão da larva de *T. muris* por pressão mecânica interna. Foi mostrado que camundongos com microbiota intestinal controlada artificialmente (*germ-free*), são refratários a infecção. Essa “resistência” estaria associada à ausência das bactérias que interagem com os plugues para possibilitar a eclosão da larva L1 no intestino do mamífero. (HAYES et al., 2010). Estudos mostram que a eclosão está diretamente ligada a concentração da microbiota do hospedeiro, além do tempo de exposição do ovo junto a mesma, sugerindo um processo de co-evolução parasito-hospedeiro em interação com a microbiota intestinal, permitindo assim o sucesso parasitário deste grupo. A interação entre o parasito e a microbiota mostra que estes nematoides são capazes de modular a microbiota intestinal (VEJZAGIĆ et al., 2015). Trabalhos mostram que existem diferenças significativas em relação ao processo de eclosão das larvas de *T.muris* em experimentos realizados *in vivo* e *in vitro*, destaca-se que variando a cepa dos microrganismos há uma significativa interferência nos resultados. A microbiota intestinal de mamíferos possui uma grande variedade e até o momento não foram realizados estudos com todos os organismos presentes neste ambiente e ainda há lacunas para interpretar a relação de múltiplas cepas de bactérias interagindo simultaneamente com os ovos em condições experimentais (KOYAMA, 2013).

Figura 10 - Fixação da região anterior de *Trichuris muris* no lúmen do intestino



Fonte: KLEMENTOWICZ; TRAVIS; GRENCIS, 2012

No epitélio intestinal, mais especificamente nas criptas de Lieberkühn do intestino grosso, encontram-se células epiteliais que, após o contato com o parasito, se proliferam para dificultar o estabelecimento do verme na mucosa do intestino, este primeiro estímulo é desencadeado pelo contato do ovo com a mucosa epitelial. Nos casos de estabelecimento da infecção, o verme consegue penetrar no intestino do hospedeiro e secretar substâncias que modulam um perfil de resposta imune que impediria o sucesso da infecção. Essa modificação da resposta imune consequentemente altera a conformação tecidual e a composição química das mucinas secretadas (KLEMENTOWICZ et al., 2012). Agentes importantes neste processo são os antígenos presentes na casca do ovo, pois ao entrar em contato com o epitélio intestinal desencadeiam uma resposta que pode conferir resistência ou susceptibilidade pelos hospedeiros. A partir de uma atividade pró-inflamatória (Th1) mais exacerbada, a secreção de citocinas anti-inflamatórias (Th2) é inibida e isso confere susceptibilidade à infecção. Quando o hospedeiro entra em contato com o ovo/larva, e imediatamente apresenta uma resposta Th2 eficiente, a composição das mucinas secretadas se modifica, há uma hiperplasia das células caliciformes e o parasito é eliminado já nos primeiros dias após a ingestão do ovo (Figura 10) (HAYES et al, 2010, KLEMENTOWICZ et al., 2012). Para proteger a região afetada pela invasão do parasito, o organismo tende a aumentar a espessura da camada do glicocálice durante a fase aguda da infecção. Esse processo se dá através do aumento de mucinas de superfície, na intenção de expulsar o parasito da região aonde se encontra inserido, evitando com que haja dano maior durante ao longo da infecção que está associada ao crescimento do parasito dentro do epitélio intestinal (HASNAIN; THORNTON; GRENCIS, 2011). Além disso, mesmo algumas linhagens de camundongos que são susceptíveis à infecção podem

manifestar resistência quando a carga de ovos administrada é muito alta, ou seja, mesmo tendo um perfil de susceptibilidade a quantidade de ovos e a antigenicidade associada influencia diretamente na resposta, conferindo resistência à infecção. Aqui nós destacamos o importante papel dos ovos no estabelecimento e manutenção da tricuriase humana e veterinária.

Fixação física: congelamento em alta pressão e substituição a frio

A microscopia eletrônica é uma metodologia amplamente utilizada em diversas áreas da ciência, tanto de matérias quanto biológica, sendo inicialmente aplicada com o uso de técnicas adaptadas de preparo, que limitava análises mais refinadas em relação a ultraestrutura celular. No começo da década de 60 iniciou o uso de aldeídos como fixados, permitindo uma melhor preservação de amostras biológicas (KARNOVSKY,1965), em seguida estas metodologias de fixação foram aprimoradas e complementadas com infiltração em resinas epóxi, seguida da ultramicrotomia permitindo a obtenção de cortes ultrafinos com menos deformidade durante o processamento (LUFT,1961). Diante de diversos desafios e limitações, a fixação química sempre foi a fronteira nas ciências biológicas, principalmente em relação a toxicidade dos fixadores, seletividade destes reagentes e os artefatos gerados nas amostras durante esta etapa do processamento das células. Os excelentes fixadores estão baseados no processo de desnaturação das proteínas, seguido da melhor estabilização estrutural em decorrência da formação de ligações cruzadas destas moléculas com o fixador.

Diante do exposto, a biologia celular de fronteira passou a investir em metodologias de fixação física por congelamento, que possui o princípio de estabilizar a amostras através da extração de calor em grande velocidade para que não seja gerado cristais de gelo hexagonais no interior celular, já que estes cristais rompem as membranas danificando as células. O alvo destes processamento de congelamento em alta velocidade é o estado vitrificado da água, o gelo em estado amorfo, com a única formação de cristais cúbicos, que não agridem a ultraestrutura celular. Outro item importante é a escolha do líquido criogênio, sendo o mais comumente utilizado o nitrogênio líquido, pois pode ser mais facilmente produzido industrialmente e não tem risco de contaminação da amostra.

Um dos tipos de congelamento mais avançado e utilizado é o congelamento sob alta pressão (High pressure freezing), essa metodologia se mostra eficiente uma vez que permite o

congelamento de amostras até 200 µm de espessura. Após o congelamento estas amostras podem ser analisadas ainda congeladas, porém isso limita o experimento a microscópios que tem sistema de criostágio. Para viabilizar a manipulação das amostras a temperatura ambiente, estas podem ser submetidas a substituição a frio (freeze-substitution), onde o processo de fixação, pós-fixação e desidratação ocorrem a baixa temperatura e imerso em um meio de substituição que contém os reagentes necessários para cada etapa deste processo. Os reagentes entram em atividade de acordo com a temperatura exposta, promovendo a troca de fluidos orgânicos pelos fixadores.

Justificativa

Atualmente na literatura encontramos estudos que utilizam a fixação química como metodologia de preservação de ovos de nematoides tricuriídeos. Trabalhos mais recentes nos apresentam a evolução do desenvolvimento do ovo em nematoides, com base principalmente no modelo *C. elegans* que é um nematoide de vida livre. Os ovos de geo-helmintos são considerados uma importante forma de resistência e diretamente associada a epidemiologia dessas parasitoses. Para que a larva consiga se desenvolver dentro do ovo e esteja pronta para uma nova infecção, depende deste contato no solo e varia de acordo com condições ambientais, como: umidade e temperatura. Após a ingestão dos ovos, os mesmos dependem de mecanismos de comunicação com o hospedeiro para que a larva ecloda no tempo certo e em seu sítio parasitário adequado. Durante este processo a larva é protegida de ações químicas de alteração de pH, ação de enzimas digestivas e do ataque de células do sistema imunológico. Destacando esta função dupla da casca dos ovos que confere proteção e comunicação junto aos sinais ambientais. Deve-se levar em conta a biologia e o ciclo do parasito, pois nematoides vivíparos possuem as camadas que recobrem o ovo diferente dos geo-helmintos de transmissão passiva que dependem da estrutura do ovo como proteção às adversidades sofridas no meio. Estudos demonstram que diferentes concentrações de cepas distintas de *E. coli* e diferentes grupos de bactérias gram positivas em diferentes tempos estão associados a eclosão das larvas de *T. muris* e *T. suis*, uma vez que essa microbiota se associa a região do plugue polar enfraquecendo-o de forma que facilite assim a eclosão da larva L1. Ao mesmo tempo que evidências mostram um processo de co-evolução parasito-hospedeiro, a relação da eclosão da larva com a presença de enterobactérias, abrem novas possibilidades

entre a adaptação destes parasitos à microbiota intestinal, ampliando espectro entre os mecanismos evolutivos de nematoides parasitos. Diante deste panorama, estudos sobre ultraestrutura de ovos de nematoides ainda são escassos, limitando a compreensão estrutural da camada que interage com o sistema imune do hospedeiro e com os microrganismos, a casca do ovo. Destacamos que neste trabalho baseamos as nossas análises em amostras fixadas fisicamente para a caracterização da ultraestrutura da casca do ovo, suas estruturas e da larva L1 de *Trichuris muris*.

1 OBJETIVO

1.1 Geral

Caracterizar a ultraestrutura da casca de ovos embrionados e da larva L1 de *Trichuris muris* fixados por congelamento por alta pressão (HPF) e submetidos a substituição a frio.

1.2 Específicos

- a) Caracterizar a morfologia geral da larva L1;
- b) Padronizar a marcação da casca e da larva;
- c) Modelar em 3D o ovo incluindo a larva L1;
- d) Quantificar e mapear a distribuição das células que formam a larva L1;
- e) Caracterizar a ultraestrutura da casca do ovo, incluindo os plugues polares;
- f) Descrever as diferentes camadas da casa do ovo;
- g) Caracterizar a ultraestrutura da larva L1.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Recuperação e manutenção dos ovos até o embrionamento

Para a obtenção dos ovos de *Trichuris muris* foi realizado o ciclo experimental do parasito em laboratório, sendo esse processo efetuado no biotério da Disciplina de Parasitologia-FCM. Os camundongos da linhagem Swiss Webster foram infectados por gavagem com 150 ovos e posteriormente mantidos em ambiente com temperatura, umidade e iluminação controladas. Após 30 dias foi realizado exame de fezes por método de sedimentação espontânea e, em seguida, a necropsia. Todo processo de manutenção do ciclo quanto, manipulação e eutanásia (Câmara de CO₂) segue o protocolo internacional com base no “Guia de Cuidado e Uso de Animais de Laboratório” preparado pela Academia Nacional de Ciências dos EUA, e do Código de Boas Práticas para Cuidados e Uso de Animais para Uso Científico Australiano e todos os procedimentos estão aprovados pelo comitê de ética local CEUA/UERJ 020/2018, de acordo com a lei federal brasileira (Lei 11.794/2008, regulamentada pelo Decreto 6.899/2009).

Durante a necropsia, os vermes adultos foram retirados da região do intestino grosso (ceco) e mantidos por 24 horas na estufa (37°C e 5% de CO₂) na Disciplina de Parasitologia em meio de cultura RPMI não suplementado, estéril e com antifúngico (250 µg/mL de fugizona - Gibco®) e antibióticos (40 mg/mL de gentamicina - Gibco®). As fêmeas foram mantidas separadamente e os ovos eliminados foram coletados com auxílio de filtros e mantidos em água estéril à 4°C. Para realizar o embrionamento, os ovos foram incubados em estufa à 27°C por 28 dias. O processo de embrionamento foi acompanhando com o auxílio de microscópio de luz para a identificação da formação das larvas. Após esse período, os ovos embrionados, foram mantidos em refrigeração a 4°C até a realização dos experimentos.

2.2 Microscopia de Luz (Campo claro e DIC)

Os ovos foram fixados quimicamente por imersão em paraformóldeido (EMS®) a 4%, diluído em tampão cacodilato (EMS®) a 0,1M por 8 horas (over-night). Em seguida foram

lavadas em salina tamponada (PBS) por 3 vezes de 15 minutos cada lavagem. Após esse período as amostras foram montadas em PBS entre lâmina e lamínula, analisadas utilizando o microscópio Nikon Eclipse 80i em modo campo claro e Diferencial Interferencial de Normasky (DIC). As imagens foram adquiridas com a câmera digital acoplada ao equipamento Nikon digital sight DS-U3.

2.3 Microscopia de Fluorescência e Confocal

As amostras fixadas foram permeabilizadas com Triton a 0,1% (Sigma®) por 12 horas e posteriormente lavados em salina tamponada (PBS) por 3 vezes de 15 minutos cada lavagem. Em seguida foram incubadas com fluocromo DAPI (Life technologies®) 300 µM por um minuto e novamente lavadas em PBS por 15 minutos. Em seguida, foram incubadas por 20 minutos em Calceína (Dinâmica®) 500 µM. Os ovos foram submetidos a marcação simples ou com dupla marcação (DAPI+Calceína). Para a análise das amostras para a fluorescência foi utilizado o microscópio Nikon Eclipse 80i, associado a seus filtros 506-534 nm (Calceína) e 358-461 nm (DAPI) e a composição das imagens foram realizadas com software NIS – Elements AR3.2.

Após o processamento para a fluorescência, o mesmo material marcado com os fluocromos foi enviado para o microscópio ZEISS LSM 710, sendo geradas imagens seriadas em alta resolução através da associação do sistema de super-resolução Elyra PS.1

2.4 Reconstrução e modelagem 3D

As séries de imagens foram obtidas por microscopia confocal e o alinhamento foi realizado utilizando os softwares Zen Black® e AMIRA-Thermo-Fisher®. A segmentação e modelagem 3D das células germinativas foram realizadas utilizando o software AMIRA-FEI Company ® através de segmentação automática por limiar de contraste.

2.5 Fixação física por Congelamento por alta pressão e substituição à frio

Para a realização de fixação física, utilizamos o processo de criofixação por congelamento em alta pressão. Os ovos, mantidos em água estéril, foram concentrados por centrifugação e acondicionados em suportes metálicos de alumínio de 3 mm de diâmetro por 0,3 mm de profundidade. Para efetuar o congelamento utilizamos o equipamento Leica HPM 100 (INMETRO-RJ) e para o armazenamento e transporte as amostras foram mantidas em garrafas térmicas contendo nitrogênio líquido. Após esse procedimento, os ovos foram submetidos ao processo de substituição à frio, utilizamos o meio composto com 2% de tetróxido de ósmio (Polysciences®), 0,1 % de glutaraldeído (EMS®), 1% de água em acetona absoluta (MERK®). A curva que utilizamos foi iniciada – 85°C durante a montagem, em seguida à -80°C por 72 horas, -20°C por 12 horas, passando por 4°C por duas horas e, finalmente, chegando a temperatura ambiente onde foram lavadas em acetona absoluta, esses procedimentos foram realizados no Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer – Instituto de Biofísica/UFRJ.

2.6 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Para a realização dos experimentos de MET, as amostras que saíram do processo de substituição à frio, já se encontravam fixadas, pós-fixadas e desidratadas. Os ovos estavam em um meio de acetona absoluta foram submetidos imediatamente ao processo de infiltração em resina epóxi EMBED-812 (Polysciences®). Durante as etapas de infiltração, foi aumentado a proporção de resina progressivamente, iniciando o experimento na proporção de 5:1 (Acetona:Resina), sendo que cada solução era mantida em contato com a amostra por 24h. Em seguida foi infiltrada em resina pura por três vezes em câmara evacuada. As amostras foram identificadas com etiquetas numeradas e montadas em blocos para o processo de polimerização, por 72 horas em uma estufa à 60° C. Após a polimerização os blocos foram trimados, obtivemos os cortes semi-finos e finalmente realizamos a ultramicrotomia. Utilizando o ultramicrotomo Leica UC6 instalado na Unidade Urogenital – IBRAG e efetuamos cortes de 60 a 70 µm de espessura, coletados em grades de cobre com 200 mesh (Copper®) cobertas com Formvar 0.5% (TedPella®). A contrastação foi realizada com 5%

de acetato de uranila aquosa (TedPella ®) por 20 minutos, lavados em água MiliQ pH 7,0, seguido da contrastação em 1% de citrato de chumbo (EMS®) por 3 minutos em câmara escura com NaOH (MERK®) (REYNOLDS, 1963). As amostras foram analisadas utilizando os microscópios eletrônicos de transmissão FEI Tecnai SPIRIT, Zeiss 900 (CENABIO- Unidade III -UFRJ) e JEOL- JEM-1011 (Plataforma de Microscopia Eletrônica Rudolf Barth - Fiocruz-RJ), todos ajustados com a aceleração de voltagem à 80 kV.

2.7 Análise estatística

Para realizar as medidas da casca e do opérculo dos ovos embrionados, utilizamos o software ImageJ, sendo analisada as medidas por cada camada e de suas subcamadas referente a quatro amostras de ovos. Em relação aos plugues polares foram medidos seu comprimento e largura de oito ovos. Lembrando que as medições só foram realizadas nas amostras que se apresentavam integras. Através do Microsoft Excel, foi realizada a média e o desvio padrão dessas medições.

3 RESULTADOS

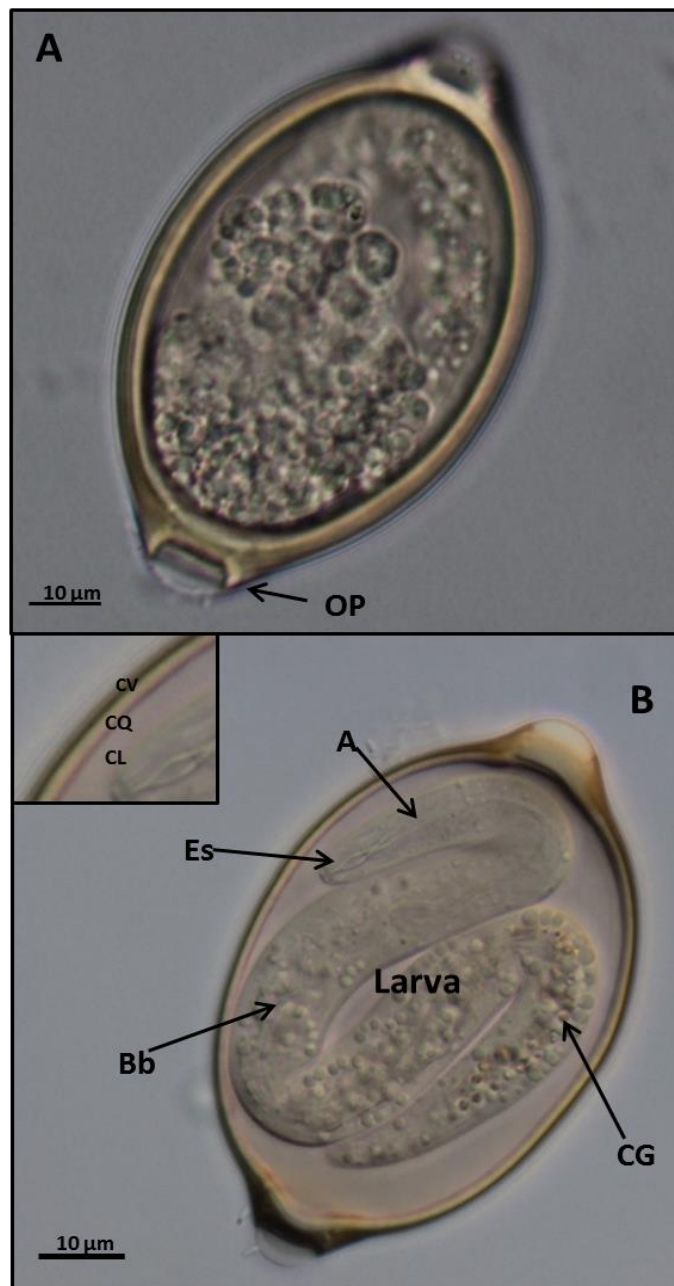
3.1 Caracterização morfológica dos ovos embrionados de *Trichuris muris* e modelagem 3D

A caracterização dos ovos de *Trichuris muris* foi realizada somente nas amostras que se encontravam com 28 dias de incubação à 27°C, sendo assim a larva L1 estava totalmente formada em seu interior, entretanto alguns ovos ainda não se encontravam em estágio de maturação. A caracterização morfológica realizada utilizando a microscopia de luz, em modo campo claro e por Contraste Diferencial Interferencial de Normaski (DIC), nos permitiu realizar a diferenciação dos ovos embrionados dos não embrionados (Figura 11 A-B), e utilizando estas ferramentas realizamos a morfometria. As imagens foram capturadas usando DIC, e foi possível identificar as três camadas majoritárias (camada vitelínica, camada de quitina e a camada lipídica) (Figura 11B – área selecionada). Vale destacar que estas três camadas estão presentes indiferentemente se o ovo se encontra embrionado ou não. Os plugues polares (opérculos), presente nos dois polos, apresentam menos refração sugerindo uma composição menos densa que o restante da casca do ovo (Figura 11B). A larva é facilmente identificada no interior do ovo e apresenta-se dobrada, e nossos resultados obtidos por DIC possibilitaram identificar na região anterior um esôfago em formação (rudimentar), destacando o desenvolvimento de parte do aparelho digestório (Figura 11B – Es). Na região posterior identificamos uma concentração de células germinativas que podem estar associadas a formação do restante do sistema digestório e do aparelho reprodutor (Figura 11B). As células que se encontram na região média do corpo, podem estar associadas a formação das estruturas da banda bacilar.

Por microscopia de fluorescência foi possível identificar os plugues polares e a casca do ovo que foram marcados e destacados pela calceína. Parte da cutícula da larva também pôde ser identificada com essa marcação (Figura 12A). Em relação as diferentes camadas da casca, a região interna (camada lipídica) e externa (camada vitelínica) foram mais destacadas por este fluorocromo, ao comparar com a fluorescência emitida pela camada de quitina. Em algumas amostras a calceína penetrou no ovo e se difundiu de forma inespecífica no fluido que envolve a larva. Referente a marcação com DAPI, a sua afinidade por ácido nucleico

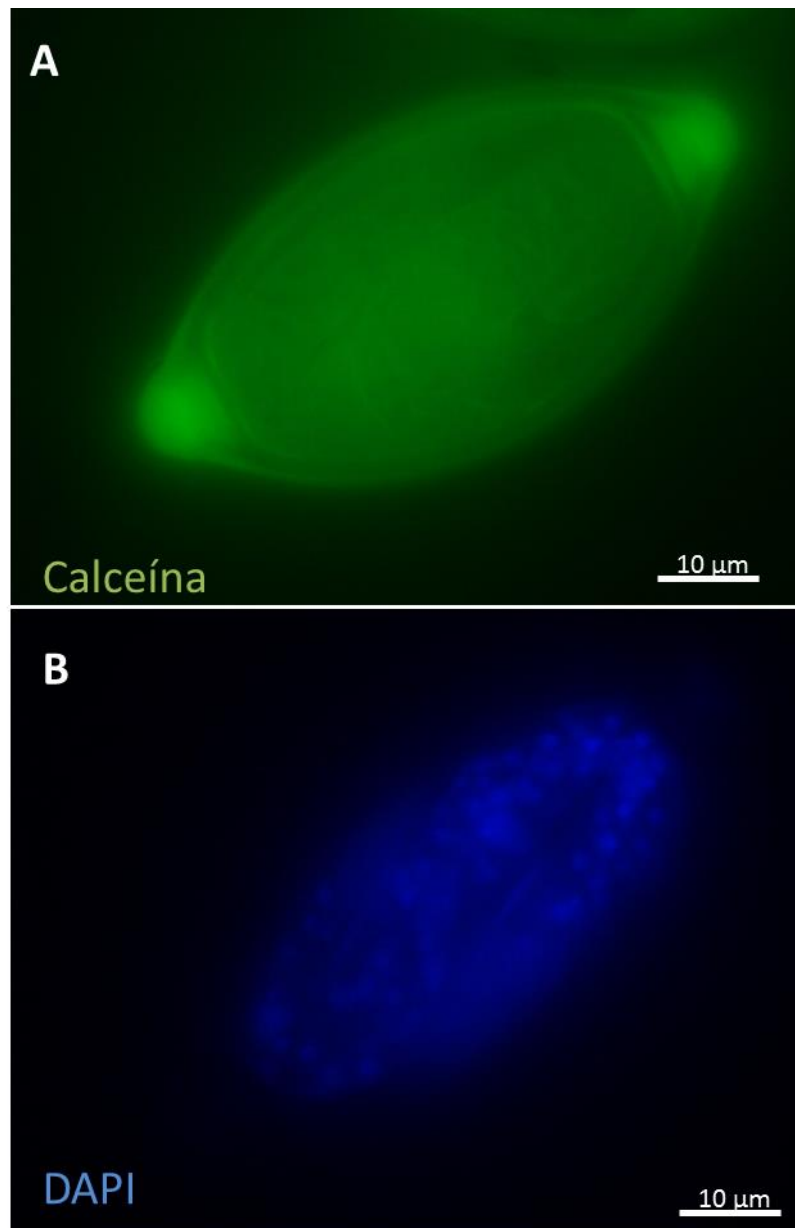
permitiu a marcação das células observadas no interior da larva, vale ressaltar que essas células também foram identificadas por DIC e se concentram na região posterior do nematoide. Com o auxílio da fluorescência foi possível detalhar a distribuição e a organização dessas células germinativas (Figura 12B).

Figura 11 - Ovos de *Trichuris muris*



Legenda: A – Ovo não embrionado observado por microscopia de luz em sistema interferencial (DIC) apresentando os opérculos (OP) nos polos; B – Ovo embrionado, região anterior da larva (A) apresentando o esôfago (Es), células associadas a banda bacilar (Bb) na região média do corpo e células germinativas (CG) na região posterior; Detalhe: Camadas da casca do ovo: CV- Camada vitelínica, CQ- Camada de quitina, CL- Camada lipídica

Figura 12 - Ovos embrionado de *T. muris* marcados com fluorescência



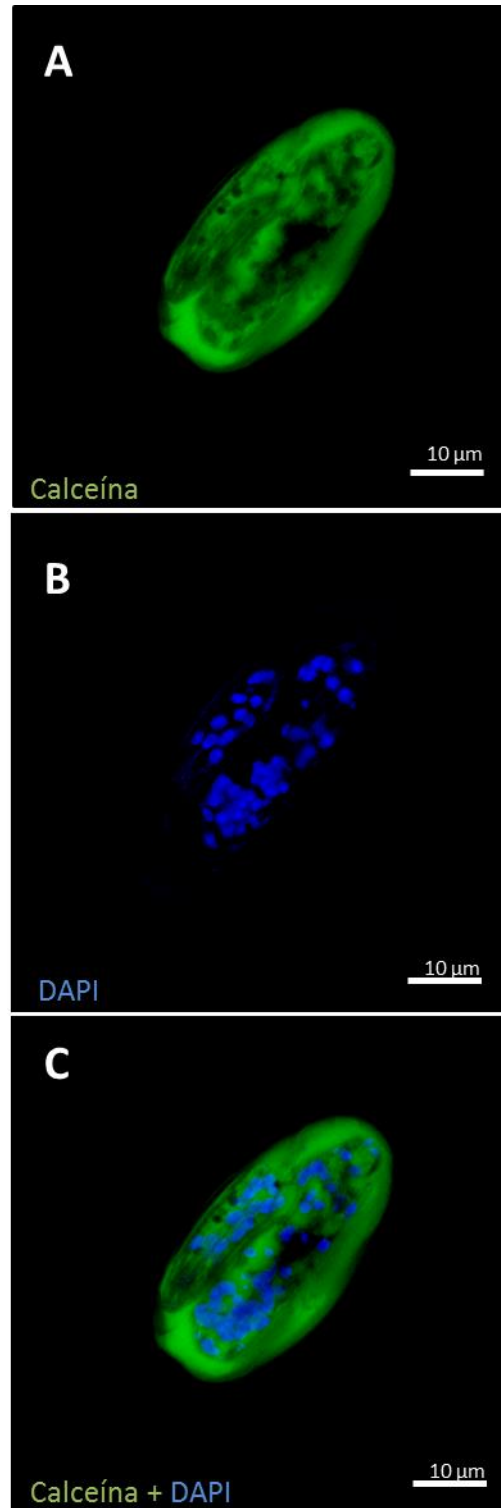
Legenda: Ovo de *T. muris* de 28 dias por microscopia de fluorescência; A – Marcação com Calceína detalhando os opérculos polares e a casca do ovo; B – Marcação com DAPI detalhando as células formadoras da larva

Com base nessas marcações, exploramos essas amostras por microscopia confocal, o que nos permitiu realizar imagens de alta resolução e resolver detalhes nos três eixos (x, y e z). Destacamos que por estes experimentos não conseguimos detalhar os plugues polares, porém obtivemos imagens com riqueza de detalhes do fluido que envolve a larva totalmente marcado pela calceína (Figura 13A) e, principalmente a distribuição espacial das células

germinativas a partir da marcação com DAPI (Figura. 13B e C). Estes experimentos foram a base da reconstrução e modelagem 3D, pelo confocal obtivemos a série de cortes ópticos no eixo z (Figura 14)

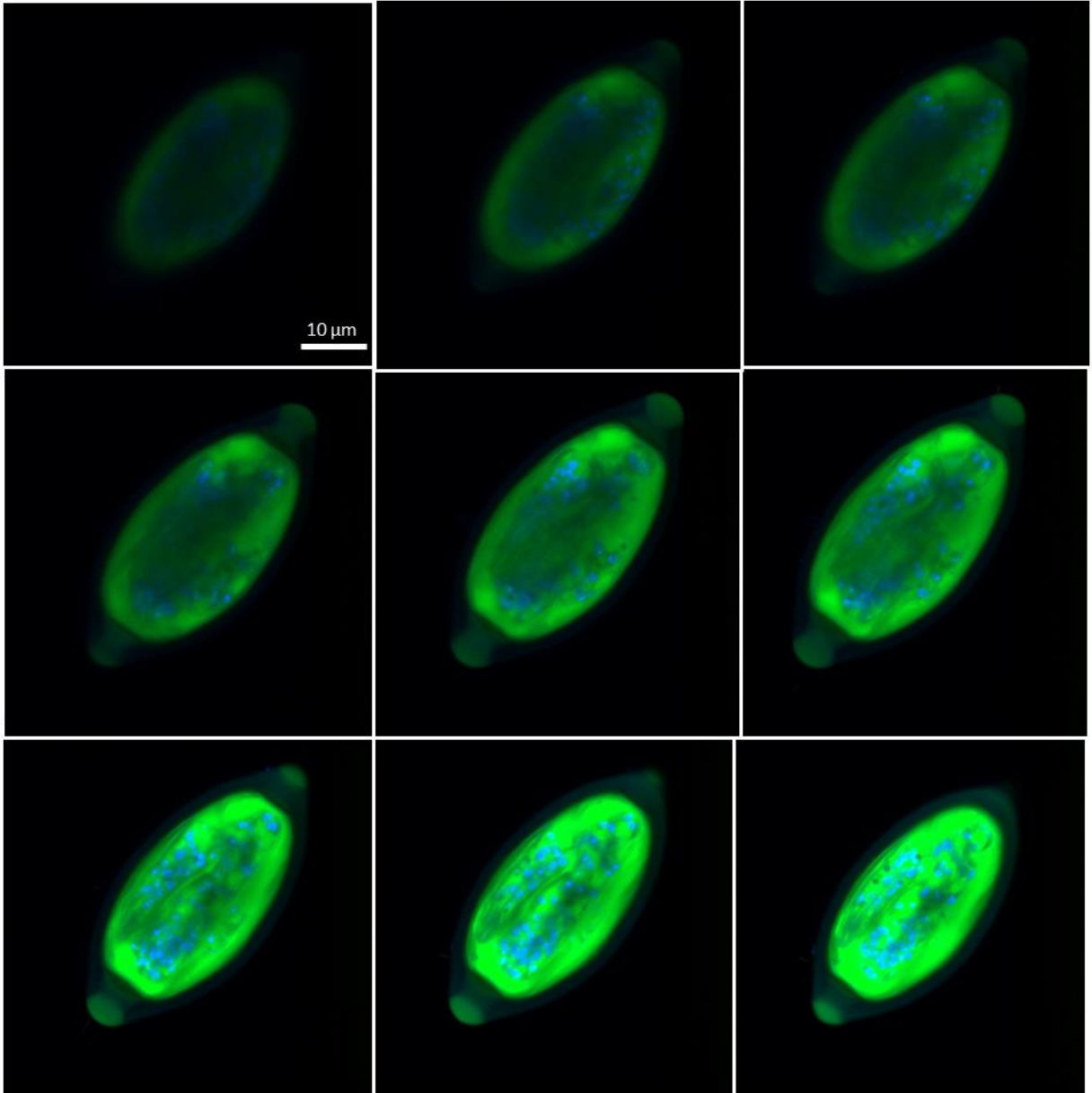
Para detalhar a distribuição, a organização e quantificar as células germinativas realizamos a modelos 3D em diferentes perfis. Para realizar esta quantificação realizamos a modelagem completa de quatro ovos embrionados e nestas amostras identificamos 151 ± 28 (130-182) células(Figura 15). Como critério de comparação, reconstruímos apenas um ovo não embrionado e identificamos 208 células embrionárias (Figura 16). Vale destacar que a resolução óptica do sistema de alta resolução nos permitiu registrar algumas dessas células em processo de divisão celular (telófase) (Figura 17), destacando o intenso processo de multiplicação que ocorre nesta fase de desenvolvimento do parasito.

Figura 13 - Ovos de *T. muris* por microscopia confocal e alta resolução



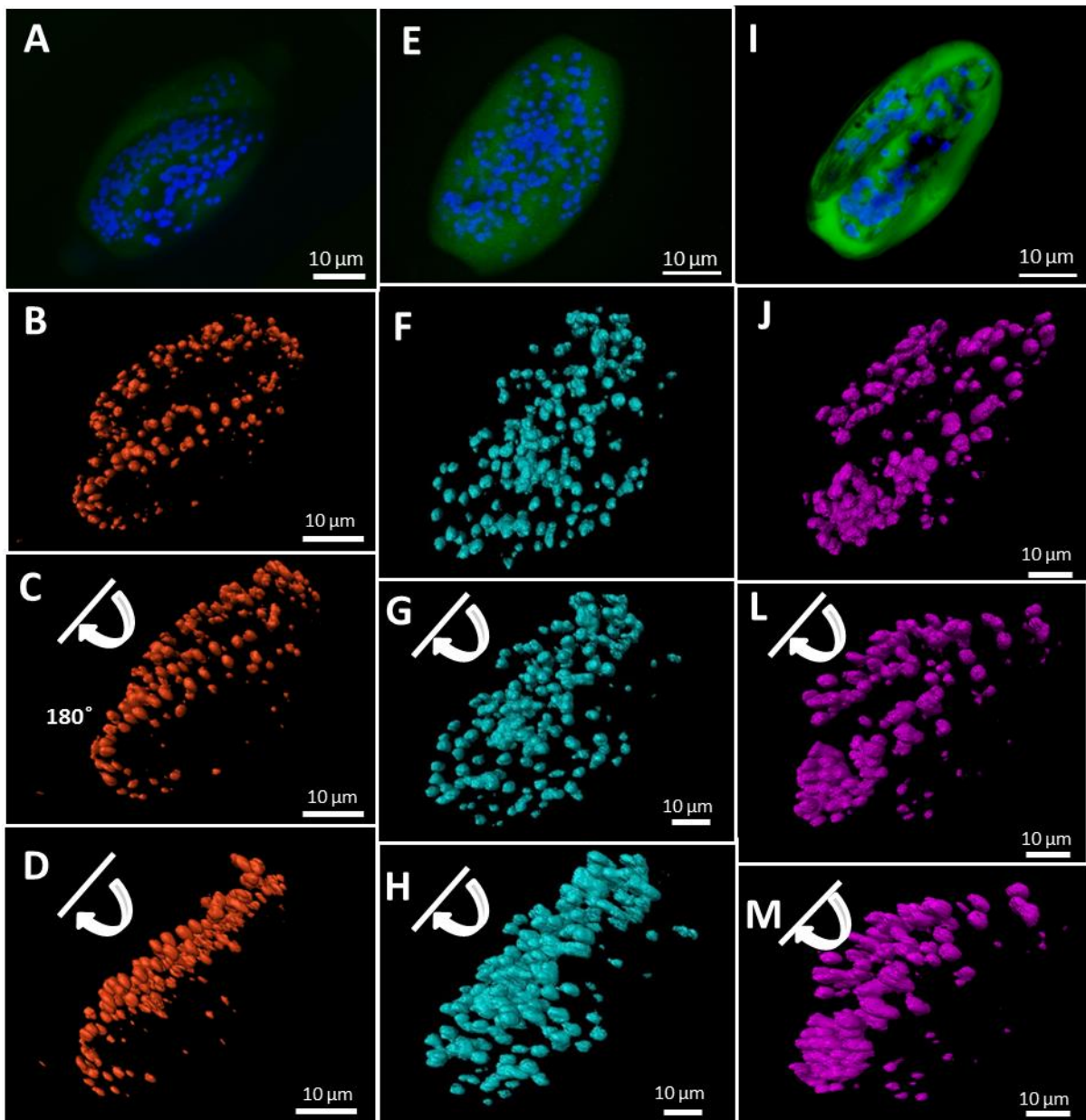
Legenda: Ovo de *T. muris* por microscopia confocal; A- Casca do ovo marcada com Calceína; B – Células germinativas formadoras da larva marcadas com DAPI; C – Dupla marcação do ovo (DAPI+Calceína)

Figura 14 - Série de imagens no ovo de *T. muris* por alta resolução



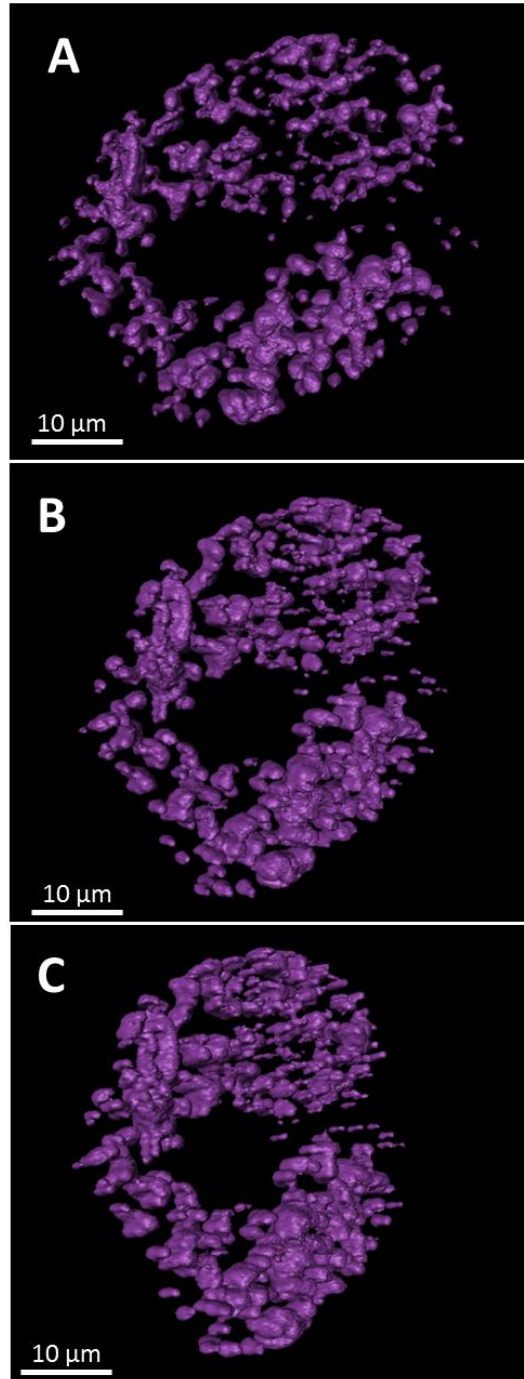
Legenda: Série de imagens marcadas com os flurocromos calceína (casca) e DAPI (células germinativas), cortes ópticos de 1 μm no eixo Z.

Figura 15 - Reconstrução 3D dos ovos embrionados de *T. muris*



Legenda: Modelagem 3D de células germinativas de ovos embrionados, mostrando a distribuição espacial dessas células. A, E e I: Imagens de microscopia confocal dos ovos embrionados com 28 dias. B-D, F-H e J-M: Modelagem 3D em diferentes ângulos. O alinhamento e reconstrução realizado pelo software Zen-Zeiss e a modelagem foi executada com o uso do software Amira Thermo-Fisher.

Figura 16 - Reconstrução 3D do ovo não embrionado de *T. muris*



Legenda: Modelagem 3D de células embrionárias de um ovo não embrionado. A-C: Modelagem 3D observada em diferentes ângulos. O alinhamento e reconstrução realizado pelo software Zen-Zeiss e a modelagem foi executada com o uso do software Amira Thermo-Fisher.

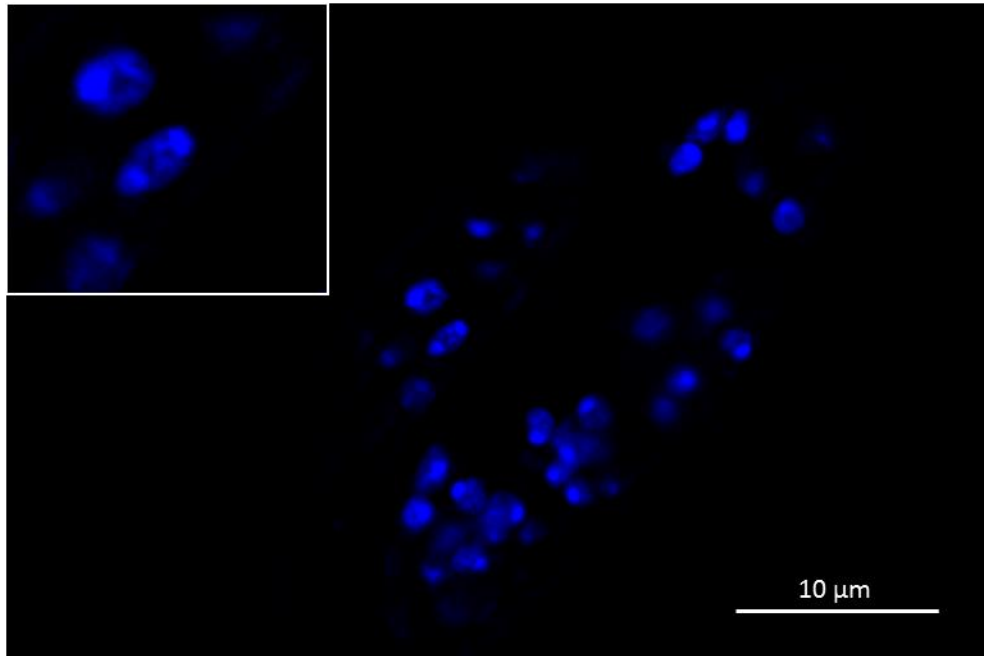
3.2 Caracterização ultraestrutural da casca do ovo e da larva de *Trichuris muris*

O uso da microscopia eletrônica de transmissão (MET), nos possibilitou detalhar a subdivisão das três camadas majoritárias que forma a casca do ovo, ressaltando que esta subdivisão não é resolvida com o uso da microscopia de luz. Os plugues polares foram identificados e apresentam menor eletrondensidade em relação ao restante da casca do ovo. O material que compões os plugues apresenta densidade uniforme e a estrutura tem $4,9 \mu\text{m} \pm 1,4$ (6,51-3,03) de profundidade e $3,8 \mu\text{m} \pm 1,5$ (6,06-1,99) de largura (Figura 18). As três camadas majoritárias possuem espessuras diferentes. A camada vitelínica (cv), mais externa e fina, não apresenta subcamadas, quando medida possui $31,79 \text{ nm} \pm 16,23$ (55,59-19,21) de espessura. Esta região apresenta uma composição amorfa, com menor densidade eletrônica e com as camadas menos definidas. A camada de quitina (cq) possui uma maior organização estrutural, tem maior eletrondensidade e é a mais espessa, é formada por 12 subcamadas e tem $1,26 \pm 0,10$ (1,36 -1,14) μm de espessura. A camada lipídica não tem subdivisões, é mais interna, apresenta menor eletrondensidade e forma a interface entre a estrutura da casca do ovo e a matriz extra-embriônica (MEx), que por sua vez cria um espaço entre a casca do ovo e o embrião. A camada lipídica apresenta $47,28 \pm 5,91$ (51,81- 49,19) nm de espessura. O total da espessura da casca do ovo tem $1,4 \pm 0,11$ (1,22 – 1,50) μm , formada por 14 subcamadas. Além da barreira promovida pelas três camadas majoritárias, internamente a larva fica envolta por mais uma camada chamada de barreira de permeabilidade (BP), por MET foi possível identificar esta barreira que apresenta alta eletrondensidade e está presente logo após a matriz extra-embriônica (Figura 19 A-B). A camada peri-embriônica forma a interseção entre a BP e a larva em seu estágio L1 (Figura 19A).

Ainda utilizando a MET nós detalhamos a ultraestrutura da larva, a cutícula do nematoide em seu primeiro estágio larval apresenta estriações cuticulares ao longo de toda extensão do corpo, variando em relação a profundidade (Figura 20A). As estriações são mais profundas na região média do corpo e na face interna da curvatura do parasito, sendo uma consequência da organização espacial da larva para que a mesma caiba dentro do ovo (Figura 20B). Não identificamos nenhuma estrutura interna nas larvas, somente grânulos com diferente eletrondensidade que parecem estar associados as células germinativas. Na extremidade anterior identificamos uma estrutura semelhante a um estilete (Figura 20B). Em detalhe foi possível caracterizar que a cutícula apresenta, ao menos, duas camadas que estarão presentes no verme adulto e já podem ser identificadas na larva L1. O limite externo da

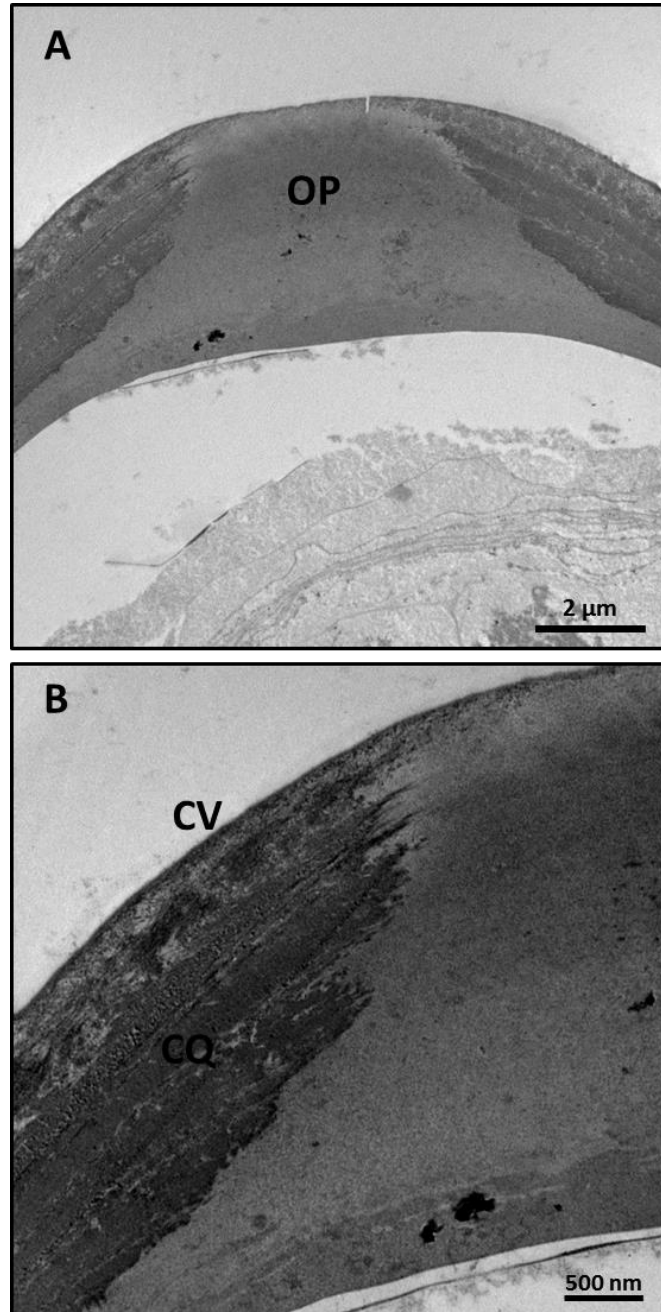
cutícula é marcada pela espicutícula e, mais internamente, acompanhando as estriações cuticulares a camada estriada também pode ser identificada que acompanha a estrutura morfológica e o desenho das estriações cuticulares (Figura. 20B). O detalhamento da região central do corpo do helminto, permitiu visualizar as estriações cuticulares mais detalhadamente além do estilete visível na região anterior do nematoide (Figura 21 A-B). Todo o protocolo foi padronizado para as amostras estudadas.

Figura 17 - Células formadoras da larva de *T. muris*



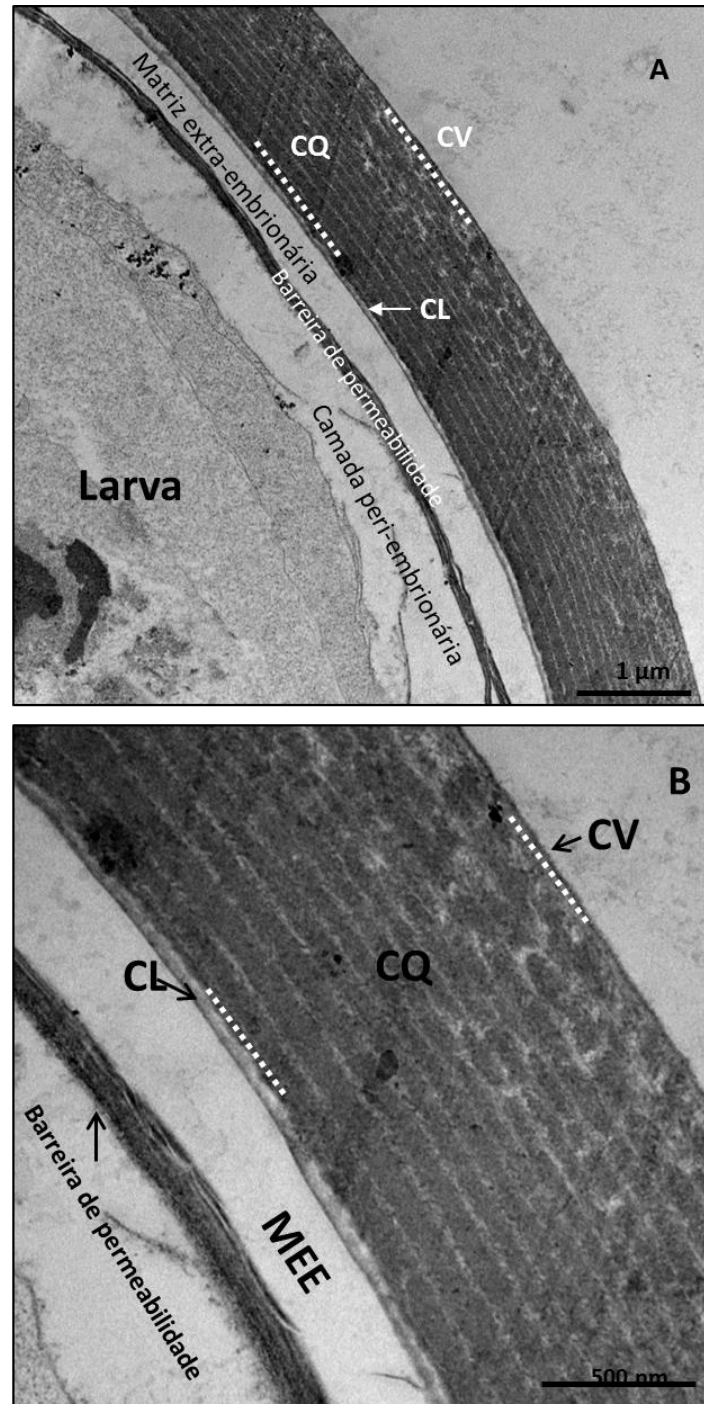
Legenda: Células marcadas com DAPI. Detalhe: célula em processo de divisão (telófase).

Figura 18 - Plugue polar do ovo embrionado de *T. muris* por MET



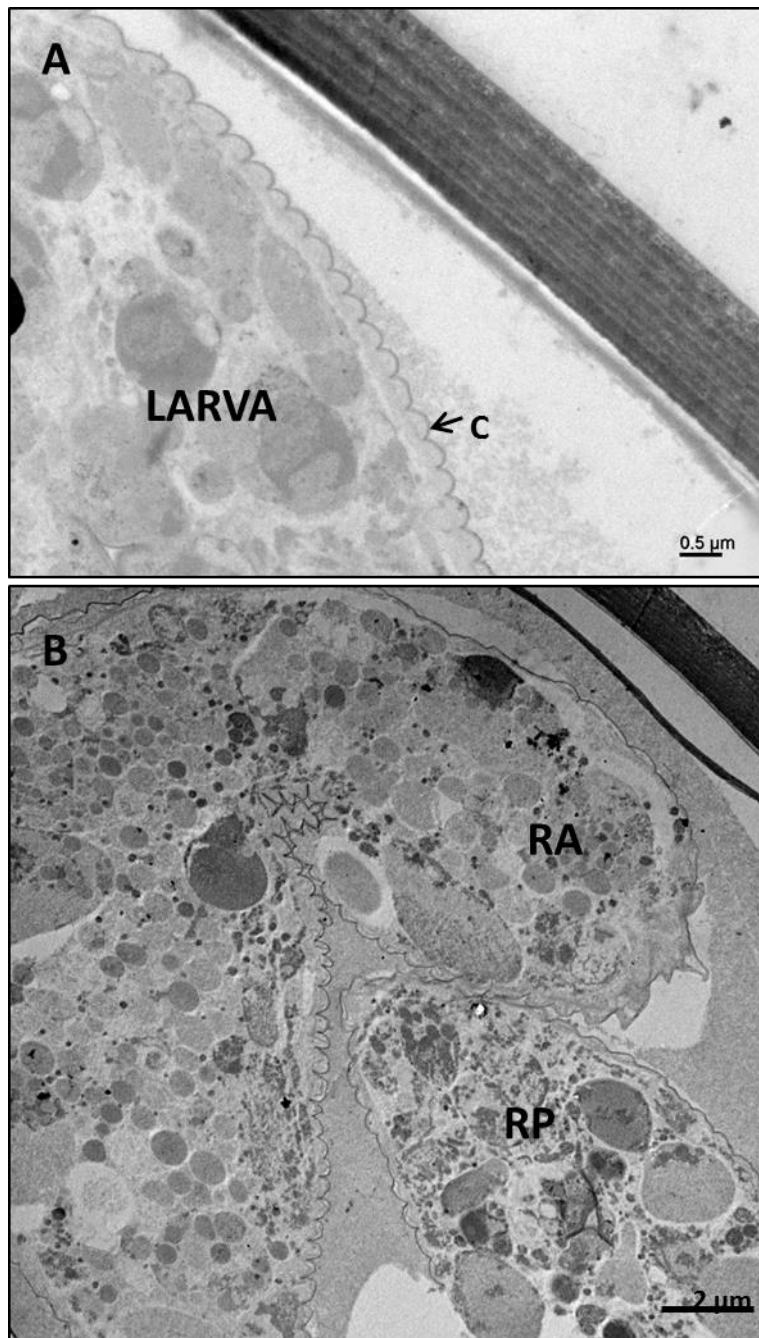
Legenda: A- Plugue polar (OP); B- Camada vitelínica (CV), Camada de quitina (CQ)

Figura 19 - Casca do ovo embrionado de *T. muris* por MET



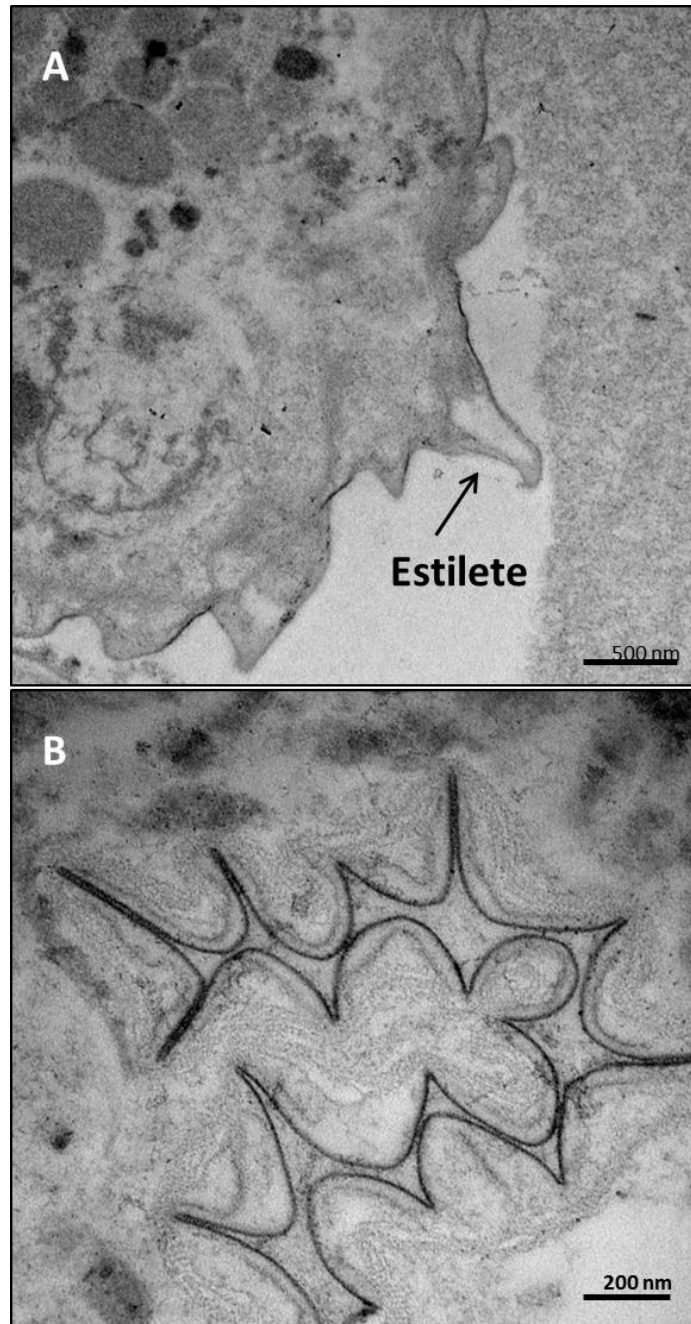
Legenda: Camadas formados da casca do ovo de *Trichuris muris*: A- Camada vitelínica (CV), Camada de quitina (CQ), Camada lipídica (CL); B- Matriz extraembriônica (MEE)

Figura 20 - Ovo embrionado de *T. muris* por MET



Legenda: A- Estriações da cutícula (C) presente na larva; B – Grânulos presentes na região anterior (RA) e na região posterior (RP) da larva.

Figura 21 - Detalhes da larva de *T. muris* por MET



Legenda: A- Estilete presente na região anterior da larva ; B – Estriações cuticulares presente na região central da larva.

4 DISCUSSÃO

O estabelecimento da infecção em nematóides de transmissão passiva se dá a partir da ingestão de ovos pelo hospedeiro. Esses ovos carregam e protegem em seu interior a larva que tem a capacidade de estabelecer a infecção. Os ovos precisam conferir resistência e possibilitar que a larva, em seu interior, receba informações para eclodir em seu sítio parasitário exato.

A composição, organização e a ultraestrutura da casca do ovo um alvo importante para entender este dinamismo estrutural que confere resistência e comunicação com o meio externo. Mesmo com a casca possuindo características que promovem impermeabilidade, protegendo o ovo de estresse osmótico, a casca também precisa possibilitar o contato com o meio externo, isso pode ser observado pela sensibilidade que os ovos têm em relação à temperatura, umidade e sinais químicos já dentro do hospedeiro. A casca é uma estrutura complexa e fornece condições fisiológicas estáveis para que ocorra o desenvolvimento da larva em diferentes condições ambientais, a protegendo até o momento da eclosão. Durante o período que os ovos se encontram no solo, eles sofrem influência da temperatura e umidade, que vai permitir o desenvolvimento da larva ou a sua manutenção como ovo não embrionado, porém sempre conferindo resistência que pode mantê-lo viável no ambiente por vários anos (LÝSEK; MALÍNSKÝ; JANISCH, 1985). In vitro, os ovos são mantidos não embrionados à 4°C e o processo de embrionamento ocorre à 27°C, estes ovos embrionados ao serem ingeridos sofrem ação de enzimas e microrganismos do trato gastrointestinal do hospedeiro, até que chegue no local de eclosão da larva (LÝSEK; MALÍNSKÝ; JANISCH, 1985).

Através do experimento com a marcação por calceína, conseguimos identificar os opérculos que foram marcados por este fluorocromo, assim como a casca. Em algumas amostras os plugues apresentaram uma marcação mais intensa em relação à casca, sugerindo uma maior permeabilidade de fluidos por esta parte do ovo em relação ao restante da estrutura da casca. Em nossos resultados, realizamos todos os experimentos com ovos embrionados, estes ovos apresentam impermeabilidade devido a camada de vitelo que o recobre, justificando a necessidade de utilizar o Triton durante um longo período para permeabilidade.

Na literatura estudos com *Ascaris*, que mostram a camada vitelínica se encontra presente nos oócitos ainda dentro do oviduto, sendo essa camada permanecendo no ovo até a eclosão da larva, permitindo assim que o ovo seja uma estrutura impermeável para que

consiga assegurar a integridade de toda composição interna do mesmo (FOOR,1967). Os oócitos ao serem direcionados à espermateca, se encontra na prófase da meiose I, em seguida ao serem fertilizados por somente um espermatozoide (SAMUEL et al., 2001). Em *C. elegans*, foi mostrado que durante o processo de fecundação é desencadeado um processo de influxo Ca^{+2} que se inicia na região de entrada dos espermatozoides e, em seguida, se espalhar em direção ao pólo oposto. Este processo ocorre na espermateca e tem duração de 2 a 4 segundos (STEIN;GOLDEN,2018). Essa onda de cálcio proporciona uma importante entrada deste metal na casca do ovo o que pode justificar a marcação da calceína na casca, como mostrado em nossos resultados com *T. muris* (FOOR, 1967; SAMUEL; MURTHY; HENGARTNER, 2001; .

Nematóides de vida livre *C. elegans* são usados como modelo experimental em diferentes áreas da biologia, existem trabalhos descrevendo o processo de formação dos ovos desde a fertilização até o momento da eclosão da larva L1, por isso, grande parte dos nossos resultados são discutidos com essa espécie. Durante a fertilização, o embrião sofre mudanças e as células embrionárias iniciam o processo de divisão. Após 150 min a 22°C estes embriões entram em processo de divisão, estando assim na fase embrionária denominada gastrulação, começando com 30 células e criando os folhetos embrionários (endoderma, mesoderma e ectoderma). No momento que a larva L1 é formada possui cerca de 600 células e muitos tecidos ainda em formação, após a eclosão o parasito crescerá dez vezes em comprimento e largura atingindo assim sua idade adulta (BARRETT, 1976; PERRY; KNOX; BEANE, 1992). Em nossos resultados observamos em um ovo não embrionado cerca de 208 células e nos embrionados 151 células germinativas. As larvas de primeiro estágio de *T. muris* apresentam uma menor quantidade de células em comparação com *C. elegans*, porém nos ovos que ainda não possuem a larva formada, o nematoide de vida livre tem menor quantidade de células germinativas em relação ao *T. muris*. Avaliamos que esta redução do número de células identificadas no ovo não embrionado em relação à larva formada pode estar relacionada ao processo de especialização de tecidos primários (hipoderme) que são responsáveis pela secreção de proteínas insolúveis que vão dar origem à cutícula. As larvas L1 de *T. muris* já possuem o corpo totalmente recoberto por cutícula, como esperado, assim como a porção inicial do sistema digestivo (capsula bucal e esôfago), estruturas que foram identificadas em nossos experimentos com DIC.

Wharton e Jenkins (1978) foram os pioneiros em estudar a casca do ovo e os plugues polares de tricurídeos no final da década de 70, quando a microscopia eletrônica estava começando a ser utilizada na helmintologia e ainda totalmente dependente dos processos de

fixação química. Estes autores exploram os ovos de *T. muris* por microscopia eletrônica de transmissão com marcações de rotina e caracterizaram as subcamadas da casca, destacando a camada de quitina que é a mais importante em relação a estrutura do ovo. Em seus resultados mostraram grânulos difusos no interior do ovo envoltos pela barreira de permeabilidade e caracterizaram a casca mostrando a camada de quitina subdividida em 12 subcamadas. Em nossos resultados não foi possível visualizar os mesmos grânulos lipídicos e de glicogênio anteriormente apresentados por Wharton e Jenkins (1978), entretanto novos experimentos de citoquímica são necessários para que haja a confirmação da composição. Dez anos antes, foram realizados experimentos com ovos de *T. vulpis* e foi mostrada a camada de quitina dividida em 19-20 subcamadas (INATOMI, 1960). Em nossos resultados vimos que se assemelha dos autores Wharton e Jenkins em 1984, que caracterizaram a camada de quitina também de ovos embrionados de *T. muris*, descrevendo 11 subcamadas, semelhante com os nossos resultados, onde descrevemos 12 subcamadas. Em relação a espessura da casca, neste trabalho de 1984 os ovos apresentaram a espessura da casca do ovo com 2,8 μm , já em nossos resultados a casca dos ovos apresentara 1,4 μm . Vale destacar que em nossos experimentos os ovos foram fixados fisicamente por congelamento em alta pressão, diferente dos trabalhos anteriores onde todas as amostras foram fixadas quimicamente por imersão em solução de Karnovsky. A fixação física possibilitou uma melhor preservação da camada vitelínica e isso pôde ser observado em nossos resultados pois a identificação desta foi realizada com mais facilidade ao comparar com trabalhos anteriores.

Ainda em relação as camadas da casca, Preston e Jenkins (1984) mostraram que no interior do ovo, na camada peri-embrionária, existem grânulos eletrondensos distribuídos de forma difusa por toda extensão interna da casca, estes foram identificados como inclusões lipídicas e de glicogênio (PRESTON e JENKINS, 1984). Em nossos resultados também identificamos grânulos eletrondensos, porém somente no interior da larva, não estando difusa na matriz extra-embrionária nem na camada peri-embrionária. Avaliamos que a fixação química pode ter comprometido a integridade das larvas e o rompimento delas pode ter liberado estes grânulos para o interior dos ovos.

A camada lipídica é a mais interna e está associada à permeabilidade dos ovos de *Trichuris*, permitindo uma comunicação com o meio externo (BIRD, 1976). Em espécies da família Ascaridae foi descrito que a camada lipídica também é formada por lipoproteínas, e neste caso essas moléculas recebem uma nomenclatura específica, chamadas de ascarosídeos (FOOR, 1967). Recentemente, um trabalho que caracterizou os ovos de *C. elegans* mostrou que além da camada lipídica existe outra estrutura, chamada de camada de permeabilidade,

que se encontra logo depois da matriz extra-embriônica. Esta camada também estaria envolvida na permeabilidade dos ovos, porém selecionando às substâncias que passariam pela casca e entrariam em contato com a larva (STEIN e GOLDEN, 2018). Em nossos resultados de MET mostramos a matriz extra-embriônica, a barreira de permeabilidade e a camada peri-embriônica, todas integras e com ótima preservação estrutural, como já foi apresentado por um esquema de ovos de *C. elegans* (STEIN e GOLDEN, 2018). Vale destacar que apesar destas camadas terem sido apresentadas de forma organizada e com espaço entre elas em um esquema publicado em 2018, não há na literatura imagens de microscopia que apresentem esta organização, destacando novamente a eficiência da fixação física.

Wharton e Jenkins em 1984 detalharam além da casca os plugues polares, uma característica única dos ovos de nematoides tricurídeos. Com base em experimentos de MET descreveram que estes plugues são formados por microfibrilas. Em nossos resultados também identificamos estruturas fibrosas preenchendo a área dos plugues polares. Em relação a morfologia, o padrão apresentado nos resultados obtidos por Wharton e Jenkins (1984) se assemelha ao observado por microscopia de luz, com os plugues formando uma projeção externa. Um ano depois um trabalho publicado detalhando os plugues dos ovos de *T. muris*, também fixados quimicamente, mostraram resultados semelhantes (PRESTON; JENKINS, 1985). Em nossos resultados de MET a superfície dos plugues apresentou um padrão não projetado, com a superfície dos plugues faceadas à mesma linha da casca do ovo. Este perfil não projetado foi observado em todas as amostras analisadas e destaca que os plugues apresentam uma certa flexibilidade e resiliência. Possivelmente a alta pressão promovida pela fixação física pode ter pressionado os plugues em direção a região interna dos ovos, pressão que não ocorre na metodologia de fixação química por imersão, como foi utilizada pelos autores mencionados anteriormente. Vale destacar também que o processo de fixação química pode gerar um estresse osmótico, aumentando a pressão interna em relação ao meio, gerando a projeção desses opérculos. Experimentos de caracterização de ovos de *T. vulpis*, também foram realizados com amostras fixadas quimicamente (INATOMI, 1960) e os plugues também foram identificados com este padrão projetado.

Em relação as medidas dos plugues, em nossas amostras identificamos que além dessas estruturas não estarem projetadas, possuem 3,8 μm de espessura por 4,9 μm de diâmetro. Inatomi em 1960, analisou o plugue polar de *T. vulpis* aonde o material foi fixado quimicamente, apresentou aproximadamente 7 μm de espessura e 9 μm de diâmetro, em comparação com as nossas amostras que apresentam.

Já foram descritos alguns estudos que avaliam a relação de espécies de *Trichuris* com a microbiota intestinal de seus hospedeiros, e foi mostrado que algumas cepas de enterobactérias apresentam uma alta afinidade pela região dos plugues. Nessa região, que é de composição fibrosa, bactérias *E. coli* que possuem uma grande produção de fimbrias do tipo 1, utilizam estas estruturas para aderirem à região dos plugues e esse processo promove uma fragilização desta região e, associado a uma pressão mecânica interna, possibilita a eclosão da larva (HAYES et al., 2010). Esse processo mecânico acontece a partir dos movimentos de contração que a larva promove dentro do ovo e pode ser identificado pelas estriações cuticulares proeminentes que são observadas na face interna da região média do corpo da larva. O processo de eclosão da larva de *Trichuris muris* é bactéria-dependente, como já foi apresentado, porém a presença de *E. coli* não tem influência sobre a taxa de eclosão em *T. suis* (VEJZAGIĆ et al., 2015). Estes mesmos autores avaliaram, *in vitro*, que a concentração de *E. coli* e o tempo que os ovos ficam interagindo com essas bactérias, tem influência na taxa de eclosão nas larvas de *T. muris* (VEJZAGIĆ et al., 2015).

Em adultos de *T. muris*, a cutícula apresenta sete camadas, sendo quatro concentradas como subcamadas da zona cortical. A cutícula de *T. suis* apresenta oito camadas, tendo cinco sub-camadas na zona cortical (JENKINS, 1969). Essa diferença e relação ao número de camadas está associado à subdivisão da zona cortical, porém as duas espécies apresentam a camada estriada neste mesmo estrato da cutícula (zona cortical), o que parece ser uma característica preservada no gênero *Trichuris* (WRIGHT, 1968; JENKINS, 1969; DECRAEMER et al., 2003; TILNEY et al., 2005). Em nossos resultados ao caracterizarmos as larvas presentes nos ovos, mostramos que esta camada estriada já pode ser identificada desde o primeiro estágio larval, reforçando que esta é uma característica marcante deste grupo e que está presente desde o primeiro estágio de desenvolvimento até o verme adulto.

Os dois geo-helminthos com maior impacto epidemiológico na saúde humana são *Ascaris lumbricoides* e *Trichuris trichiura* (WHO, 2019). O estágio larval que está presente no ovo tem influência no tempo de embrionamento e na capacidade de penetração no tecido hospedeiro ao ser ingerido. Ovos de *Ascaris suum* e *Trichuris muris* foram incubados experimentalmente para que o processo de embrionamento ocorresse e que a larva infectante fosse identificada (KIRCHGÄSSNER et al., 2008). Em *A. suum* a MET permitiu identificar diferentes camadas de cutícula sobrepostas, confirmando que o estágio larval presente no ovo embrionado é o terceiro (L3). Em *T. muris* foi mostrado que não há sobreposição de cutícula e apenas uma camada foi identificada, como observado em nossos resultados. Esses dados nos permitem afirmar que no ovo embrionado está presente uma larva de primeiro estágio. Em *A.*

suum, o tempo de embrionamento é maior (40 dias) em comparação com *T. muris*, a L3 ao eclodir apresenta alta motilidade, possibilitando a eclosão, principalmente neste grupo onde os ovos não apresentam opérculo e são providos de duas camadas a mais em comparação com *Trichuris* spp. Apesar de serem larvas de primeiro estágio possuem uma camada cuticular bem desenvolvida, com estriações cuticulares muito evidentes, capsula bucal e esôfago formado, estas estruturas já haviam sido descritas anteriormente e foram também identificadas em nossos resultados (KIRCHGÄSSNER et al., 2008).

Ainda na caracterização da larva, foi possível identificar na extremidade anterior a presença de uma estrutura pontiaguda, o que se assemelha à um estilete bucal. O estilete presente na larva L1 também já foi associado ao processo de eclosão (BEER, 1973) e também foi descrito na primeira e segunda fase larval de *Trichuris ovis* (THAPAR e Singh, 1953). Fülleborn (1923) mostrou que as larvas (L1-L3) de *T. trichiura*, *T. leporis*, *Trichinella spiralis*, *Capillaria hepatica* e *Trichosomoides crassicauda* também apresentam estilete, porém essa estrutura não foi identificada em L4 e no verme adulto. Estudos posteriores identificaram o estilete no verme adulto em *Trichinella spiralis*, *T. trichiura*, *T. vulpis* e *Trichuris landak* (LI, 1933; SOMEREN, 1939; BURROWS e LILLIS, 1964; PURWANINGSIH, 2013) e em *T. muris* (dados não publicados). Em *Trichinella spiralis* e *T. vulpis*, esta estrutura foi sugerida como importante mecanismo para o parasitismo intestinal, Someren (1939) propôs que o estilete permite a laceração do tecido hospedeiro e abrindo um túnel tecidual no intestino delgado e permitindo a penetração do *T. spiralis*. O estilete de *T. vulpis* foi descrito fazendo um movimento anteroposterior causado pela contração do esôfago e uma rápida atividade vibratória lateral. Essa estrutura pontiaguda, em constante movimento, pode promover o corte do tecido do intestino grosso durante o parasitismo (BURROWAS e LILLIS, 1964). Durante o parasitismo, os tricurídeos enterram a sua região anterior na mucosa intestinal, resultando na destruição das membranas laterais enquanto deixam a superfície apical e basal intacta, entretanto formam tuneis utilizando o citoesqueleto apical e basal das células epiteliais mortas como um arcabouço (TILNEY et al., 2005).

Avaliando a associação dos nossos resultados com trabalhos precedentes, é possível inferir que vários fatores influenciam no sucesso parasitário deste grupo e na capacidade da eclosão das larvas de primeiro em *Trichuris* spp. A ultraestrutura da casca do ovo destaca a capacidade de resistência dos ovos, característica que é de extrema importância para os geohelminhos. Porém, a presença dos opérculos e o material que forma estas estruturas promovem flexibilidade e a capacidade de absorver fluidos, podendo influenciar na comunicação das células embrionárias e da larva com o meio externo. Além disso, a ultraestrutura fibrosa dos

plugues, possibilita a interação com enterobactérias fragilizando esta área da casca do ovo e sendo mais um fator que viabiliza a saída da larva. Esta larva, mesmo de primeiro estágio, apresenta boa motilidade, a cutícula bem desenvolvida e um estilete na extremidade anterior, o que também deve estar associada ao seu potencial de eclosão. A larva de *Trichuris muris*, necessita de apenas 28 dias de embrionamento (in vitro) para estar apta para o estabelecimento de uma nova infecção, ao invadir um novo hospedeiro estas larvas continuam seu desenvolvimento ao longo do sistema digestório do mamífero, destacando que é a larva L3 que penetra no epitélio do intestino grosso após 17 dias de infecção, e isso também pode ter definido o sítio parasitário destes nematoides.

CONCLUSÕES

- a) Os ovos de *Trichuris muris* possuem um sistema de alta resistência promovida pelas camadas que formam a casca do ovo;
- b) Os plugues polares são formados por um material fibroso de baixa eletrondensidade, que confere a casca do ovo um potencial de comunicação com o meio externo;
- c) O processo de embrionamento que desencadeou a formação das larvas L1, proporcionou uma redução no número de células nos ovos embrionados em comparação com os não embrionados;
- d) A eclosão da larva L1 é viabilizada pela associação de fatores como: a resistência da casca do ovo, a fragilidade dos plugues polares e a presença de estilete.

REFERÊNCIAS

BARRETT, J. Studies on the induction of permeability in *Ascaris lumbricoides* eggs. **Parasitology**, v. 73, n. 1, p. 109–121, 1976.

BEER, R. J. S. Studies on the biology of the life-cycle of *Trichuris suis* Schrank, 1788. **Parasitology**, v. 67, n. 03, p. 253, 6 Dez. 1973.

BIRD, A. F. & MCCLURE, M. A. (1976). The tylenchid (Nematoda) eggshell: structure, composition and permeability. **Parasitology** 72, 19-28.

BROOKER, S. **Estimating the global distribution and disease burden of intestinal nematode infections: Adding up the numbers - A review** *International Journal for Parasitology* Europe PMC Funders.

BROOKER, S.; CLEMENTS, A. C. A.; BUNDY, D. A. P. **Global Epidemiology, Ecology and Control of Soil-Transmitted Helminth Infections** *Advances in Parasitology*, 2006.

BURROWS, R.B., LILLIS, W.G., 1964. The whipworm as a blood sucker. **J. Parasitol.** 50 (5): 675-680.

COURA, J R. **Dinâmica das Doenças Parasitárias. Rio de Janeiro: Gunabara Koogan**, 1V. pág 1034-1038, 2005.

CHITWOOD, B. G.; CHITWOOD, M. B. Section I. Anatomy. **An Introduction to Nematology**, p. 213, 1950.

DECRAEMER, W., KARANASTASI, E., BROWN, D., BACKEÇJAU, T. 2003. Review of the ultrastructure of the nematode body cuticle and its phylogenetic interpretation. **Biology Reviews**, 78: 465–510.

DUNN, J. J. et al. *Trichuris vulpis* recovered from a patient with chronic diarrhea and five dogs. **Journal of clinical microbiology**, v. 40, n. 7, p. 2703–4, Jul. 2002.

EDGAR, L. G. Blastomere culture and analysis. **Methods in cell biology**, v. 48, p. 303–21, 1995.

FÜLLEBOMN, F. 1923. Über den Mundstachel der Trichotracheliden-Larven und Bemerkungen über die jüngsten Stadien von *Trichocephalus trichiurus*. **Arcj. Schiff. & Tropenhyg.** 27: 421-425.

FOOR, W. E. Ultrastructural aspects of oocyte development and shell formation in *Ascaris lumbricoides*. **The Journal of parasitology**, v. 53, n. 6, p. 1245–61.

HALL, D. H.; ALTUN, Z. F. **C. elegans atlas**. [s.l.] Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2008.

- HASNAIN, S. Z.; THORNTON, D. J.; GRENCIS, R. K. Changes in the mucosal barrier during acute and chronic *Trichuris muris* infection. **Parasite immunology**, v. 33, n. 1, p. 45–55, Jan. 2011.
- HAYES, K. S. et al. Exploitation of the Intestinal Microflora by the Parasitic Nematode *Trichuris muris*. **Science**, v. 328, n. 5984, p. 1391–1394
- HOTEZ, P. J. et al. Helminth infections: the great neglected tropical diseases. **The Journal of clinical investigation**, v. 118, n. 4, p. 1311–21, Abr. 2008.
- INATOMI, S. Submicroscopic structure of the egg shell of helminth. A study on *Trichuris vulpis*. **Acta Med.**, v. 14, n. 4, p. 257–260, 1960.
- JENKINS, T. 1969. Electron microscope observations of the body wall of *Trichuris suis*, Schrank, 1788 (Nematoda: Trichuroidea). **Z. Parasitenk.** 32, 374-387.
- JOHNSTON, W. L.; DENNIS, J. W. The eggshell in the *C. elegans* oocyte-to-embryo transition. **genesis**, v. 50, n. 4, p. 333–349.
- JOHNSTON, W. L.; KRIZUS, A.; DENNIS, J. W. Eggshell chitin and chitin-interacting proteins prevent polyspermy in *C. elegans*. **Current Biology**, 2010.
- JOURDAN, P. M. et al. Soil-transmitted helminth infections. **The Lancet**, v. 391, n. 10117, p. 252–265, 2018.
- KARNOVISK, MJ. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **J. Cell Biol.** 24: 137A-138.
- KATZ, N. **Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose mansoni e Geohelmintos**. Belo Horizonte: Centro de Pesquisa René Rachou, 2018.
- KIRCHGÄSSNER, M. et al. What are the infectious larvae in *Ascaris suum* and *Trichuris muris*? **Parasitology Research**, v. 103, n. 3, p. 603–607, 2008.
- KLEMENTOWICZ, J. E.; TRAVIS, M. A.; GRENCIS, R. K. *Trichuris muris*: A model of gastrointestinal parasite infection. **Seminars in Immunopathology**, v. 34, n. 6, p. 815–828, 2012.
- KOYAMA, K. Evidence for bacteria-independent hatching of *Trichuris muris* eggs. **Parasitology Research**, v. 112, n. 4, p. 1537–1542.
- LI, H.C. 1933. On the mouth-spear of *Trichocephalus trichiurus* and of a *Trichocephalus* sp. from monkey, *Macacus rhesus*. **Chinese Med. J.**, 47: 1343-1346.
- LOPES-TORRES, E. J. **Aspectos morfológicos e ultraestruturais da relação *Trichuris thrichomysi* e *Trichuris muris* com seus hospedeiros vertebrados**. 2011. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2011.
- LÝSEK, H.; MALÍNSKÝ, J.; JANISCH, R. Ultrastructure of eggs of *Ascaris lumbricoides* Linnaeus, 1758. I. Egg-shells. **Folia parasitologica**, v. 32, n. 4, p. 381–384, 1985.

MONTEIRO, K. J. L. et al. Focal persistence of soil-transmitted helminthiases in impoverished areas in the State of Piauí, Northeastern Brazil. **Journal of the São Paulo Institute of Tropical Medicine**, v. 60, p. 1–10, 2018.

NEVES, D. P. *Parasitologia Humana*. 11 ed. São Paulo: Atheneu, 2004.

OLSON, S. K. et al. Hierarchical assembly of the eggshell and permeability barrier in *C. elegans*. **Journal of Cell Biology**, v. 198, n. 4, p. 731–748, 2012.

OPAS, O.P.A.S Relatório da OMS informa progressos sem precedentes contra doenças tropicais negligenciadas, 2017 <https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5401:relatorio-da-oms-informa-progressos-sem-precedentes-contradoencas-tropicais-negligenciadas&Itemid=812> Acesso em: 30 jan. 2019.

PATRA, G. et al. Studies on antigenic cross-reactivity of *Trichuris ovis* with host mucosal antigens in goat. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 5, n. 12, p. 935–939.

PERRY, R. N.; KNOX, D. P.; BEANE, J. **Enzymes released during hatching of *Globodera rostochiensis* and *Meloidogyne incognita*** *Fundam. appl. Nematol.* [s.l: s.n.].

PIKE, E. H. **Egg Output of *Trichuris muris* (Schrank, 1788)** Source: The Journal of Parasitology. [s.l: s.n.].

PRESTON, C. M.; JENKINS, T. *Trichuris muris*: structure and formation of the egg-shell. **Parasitology**, v. 89, p. 263–273, 1984.

PRESTON, C. M.; JENKINS, T. *Trichuris muris*: Structure and formation of the egg polar plugs. **Z Parasitenkd**, 1985.

PURWANIGSIH, E., 2013. The first report of new species: *Trichuris landak* n.sp. **Asian Pac. Trop. Biomed.** 3 (2): 85-88.

REY, L. **Parasitologia - Parasitos e Doenças Parasitárias do Homem nos Trópicos Ocidentais** 4 eds. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. **The Journal of cell biology**, v. 17, n. 1, p. 208–212, 1963.

ROCHA, S. et al. Environmental analyses of the parasitic profile found in the sandy soil from the Santos municipality beaches, SP, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 53, n. 5, p. 277–281, 2011.

SAMUEL, A. D. T.; MURTHY, V. N.; HENGARTNER, M. O. Calcium dynamics during fertilization in *C. elegans*. **BMC Developmental Biology**, v. 1, p. 1–6, 2001.

SCHIMIDT, G.D., ROBERTS, L.S. **Foundations of parasitology**, 7 ed. WCB, Dubuque. pág 367-391 2004.

SOMEREN, V.D., 1939. On the presence of a buccal stylet in adult *Trichinella*, and the mode of feeding of the adults. **J. Helminth.** 17 (2): 83-92.

STEIN, K. K.; GOLDEN, A. The *C. elegans* eggshell. **WormBook : the online review of C. elegans biology**, v. 2018, p. 1–36, 2018.

THAPAR, G.S, SINGH, S. 1953. Studies on the life-history of *Trichuris ovis* (Abildgaard, 1795) (Fam.Trichuridae: Nematoda). **Proc. Indian Acad. Sci.** 40 (3): 69-88.

TILNEY, L.G., CONNELLY, P.S., GUILD, G.M., VRANICH, K.A., ARTIS, D., 2005.

Adaptation of a nematode parasite to living within the mammalian epithelium. **J. Exp. Zool.** 303 (A), 927–945.

TORRES, E. J. L. et al. A new species of *Trichuris* from *Thrichomys apereoides* (Rodentia: Echimyidae) in Brazil: Morphological and histological studies. **Veterinary Parasitology**, 2011.

VEJZAGIĆ, N. et al. Bacteria-induced egg hatching differs for *Trichuris muris* and *Trichuris suis*. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 1, p. 371, 15 Dez. 2015.

WHARTON, D. Nematode egg-shells. **Parasitology**, v. 81, p. 447–463, 1980.

WHARTON, D. A.; JENKINS, T. Structure and chemistry of the egg shell of a nematode (*Trichuris suis*). **Tissue and Cell**, v. 10, n. 3, p. 427–440, 1978.

WHO, W. H. O. **Proportion of children (1-14 years of age) in the country requiring preventive chemotherapy (pc) for soil-transmitted helminthiases worldwide**, 2015. Disponível em: <http://gamapserv.who.int/mapLibrary/Files/Maps/STH_2014.png> . Acesso em: 20 dez. 2018

WHO, W.H.O. **Helminthiasis transmitidas por el suelo** , 2019. Disponível em: <<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/soil-transmitted-helminth-infections>> Acesso: 24 abril 2019.

WRIGHT, K.A. 1968. Structure of the bacillary band of *Trichuris myocastoris*. **J. Parasitol.** 54 (6), 1106-1110.

KARNOVISK, MJ. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **J. Cell Biol.** 24: 137A-138.