

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIENCIAS
VETERINÁRIAS

DISSERTAÇÃO

UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DE ‘WESTERN BLOTTING’ PARA
DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO POR *Cystoisospora felis* (WENYON, 1923)
FRENKEL, 1977 (APICOMPLEXA: CYSTOISOSPORINAE) EM
COELHOS (*Oryctolagus cuniculus*)

GISELE SANTOS DE MEIRELES

2009



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DE 'WESTERN BLOTTING' PARA
DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO POR *Cystoisospora felis* (WENYON, 1923)
FRENKEL, 1977 (APICOMPLEXA: CYSTOISOSPORINAE) EM
COELHOS (*Oryctolagus cuniculus*)**

GISELE SANTOS DE MEIRELES

Sob a Orientação do Professor

Dr. Carlos Wilson Gomes Lopes

e Co-orientação

Dr. Walter Flausino

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Veterinárias**, Área de Concentração em Parasitologia Animal.

Seropédica, RJ

Fevereiro de 2009

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS




GISELE SANTOS DE MEIRELES

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências** no curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Parasitologia Veterinária.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 27/02/2009



Carlos Wilson Gomes Lopes (PhD, L.D.) UFRRJ
(Orientador)


Dr. Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira *PhD* (LSA/UENF)
Dr. George Rego Albuquerque D.Sc (DCAA/UESC)
Dr. Walter Flausino *PhD* (DPA/UFRRJ)
Dr. Wilson Jacinto Silva de Souza D.Sc (IOC/FIOCRUZ)

DEDICATÓRIA

A Deus, que me ampara e me fortalece em todos os momentos de minha vida estando no princípio das coisas para os que nele crêem e ao fim de todas as reflexões dos que questionam a existência humana.

A meu pai, João Cruz de Meireles “ in memorian”.

A meus familiares e amigos pelo carinho, paciência, amizade e incentivo.

A meu amigo e companheiro, Adriano de Carvalho Ferreira pela força e compreensão pelos momentos de ausência.

A vocês dedico à arte final deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS, que como ser maior me deu suporte em um dos momentos mais difíceis de minha vida, qual foi o início de minha caminhada profissional. Ele, tenho certeza não me deixou abandonar minha caminhada.

A minha mãe JULINDA MARIA SANTOS DE MEIRELES e irmã SHEILA SANTOS DE MEIRELES e a toda minha família, que me deram apoio, incentivo e sabedoria para que eu pudesse concretizar mais esta etapa.

A meu namorado ADRIANO DE CARVALHO FERREIRA, que esteve ao meu lado sempre apoiando e incentivando meus objetivos.

Um especial agradecimento aos meus três pais científicos: Prof. Dr. CARLOS WILSON GOMES LOPES, PAULO ROBERTO DE CARVALHO FILHO E Prof. Dr. WALTER FLAUSINO. Sendo estes os principais pilares para minha formação profissional. E principalmente Ao Prof. Dr. CARLOS WILSON GOMES LOPES E Prof. Dr. WALTER FLAUSINO, agradeço pelo apoio, amizade, confiança e competência a que me dispensaram durante toda a fase da pós-graduação e para o desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigada!

Aos meus queridos colegas de laboratório, Prof. Dr. WALTER LEIRA TIXEIRA FILHO, Prof. Dr. GEORGE REGO ALBUQUERQUE, BRUNO PEREIRA BERTO, DAIANA MIQUELOTTI, LIANNA MARIA BALTHAZAR, SERGIAN VIANA CARDOZO, MARIA EDUARDA SANTOS e a minhas amigas JANAÍNA DA SOLEDAD RODRIGUES, ELAN CARDOSO PAES-DE-ALMEIDA em especial a LANDREANI RAMIREZ GONÇALVES pela convivência harmoniosa, seriedade e parceria. Muito obrigada.

A equipe do laboratório de doenças parasitárias (LDP), sempre solícitos aos meus pedidos de ajuda.

A SOLANGE RODRIGUES FERREIRA agradeço pela ajuda, treinamento, orientação e troca de idéias com relação ao uso dos programas utilizados para fazer este trabalho.

A VANESSA DE ALMEIDA RAIA, pela valiosa troca de idéias para o direcionamento deste trabalho.

Aos meus amigos de pós-graduação, em especial CHARLES PASSOS RANGEL e PATRÍCIA BARIZON CEPEDA, que fazem com que a vida não seja somente um mar de trabalho, amenizando as atribuições do meu cotidiano com boas conversas. Muito obrigada.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento deste trabalho.

BIOGRAFIA

GISELE SANTOS DE MEIRELES, filha de Julinda Maria Santos de Meireles e João Cruz de Meireles, brasileira, nasceu em 30 de junho de 1980, no município do Rio de Janeiro, no estado do Rio de Janeiro.

Ingressou no curso de Medicina veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro em agosto de 2001. Em setembro de 2003, ingressou como estagiária vinculada ao SINTEEG no Laboratório de Coccídios e Coccidioses, do departamento de Parasitologia Animal, sob orientação do Professor Dr. Carlos Wilson Gomes Lopes. Em agosto de 2004, iniciou como bolsista de Iniciação Científica do Programa Institucional de bolsas de Iniciação Científica (PIBIC – CNPq/UFRRJ), permanecendo por dois anos até julho de 2006.

Em 17 de Novembro de 2006, graduou-se em Medicina Veterinária, tendo então depois de um período de quatro meses ingressado no curso de pós-graduação em Ciências veterinárias, na área de concentração de Parasitologia Animal. Durante este período, foi bolsista da CAPES.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Relação filogenética entre espécies do gênero <i>Cystoisospora</i> e outros coccídios spp., baseada pela análise do gene transdutor ITS1 do RNAr, de acordo com SAMARASINGHE et al. (2008).....	11
Figura 2. Determinação do percentual de esporulação por dia de eliminação das fezes de dois gatos experimentalmente infectados com oocistos esporulados de <i>Cystoisospora felis</i>	14
Figura 3. Dupla camada primária e secundária de solução de sacarose (ARROWOOD; STERLING, 1987) com adaptações.....	16
Figura 4. Oocistos esporulados de <i>Cystoisospora felis</i> , após a utilização do processo de limpeza de resíduos fecais. Solução de sacarose (escala = 10µm).....	16
Figura 5. Sistema completo para realização da eletroforese descontínua em gel de poliacrilamida-SDS. Fonte geradora de corrente elétrica (A), Cuba para eletroforese (B) e Unidade de refrigeração (C).....	18
Figura 6. Eletroforese descontínua em gel de poliacrilamida a 10% (A), em detalhe os poços isolados para aplicação das amostras e as mesmas se deslocando em função do campo elétrico (B).....	18
Figura 7. Resultado do teste de ‘Western Blotting’ em soro de coelho experimentalmente infectado em canaletas isoladas (A) montagem dos blots em Cartolina branca para análise das bandas (B).....	21
Figura 8. Reta de regressão dos valores de diâmetro maior e diâmetro menor dos oocistos esporulados de <i>C. felis</i>	23
Figura 9. Distribuição das medias das frequências dos oocistos esporulados de <i>Cystoisospora felis</i> recuperados de fezes de gatos experimentalmente infectados. (a) Diâmetro maior, (b) Diâmetro menor e (c) Índice morfométrico.....	24
Figura 10. SDS-PAGE a 10% de proteínas de oocistos esporulados de <i>Cystoisospora felis</i> . À esquerda, padrões de peso molecular e à direita, proteínas de oocistos esporulados de <i>C. felis</i> em quilodaltons (KDa), coradas pelo azul de Coomassie 250R.....	26

Figura 11. Gráfico do pico de densidade das bandas reveladas nos zimogramas, do SDS-PAGE a 10%.....	27
Figura 12. SDS-PAGE a 12% de proteínas de oocistos esporulados de <i>Cystoisospora felis</i> . À esquerda, padrões de peso molecular e à direita, proteínas de oocistos esporulados de <i>C. felis</i> em quilodaltos (KDa), coradas pelo azul de Coomassie 250R.....	29
Figura 13. Gráfico do pico de densidade das bandas reveladas nos zimogramas, do SDS-PAGE a 12% de oocistos esporulados de <i>C. felis</i>	30
Figura 14. Resultado do Western blotting com soro heterólogo anti- <i>C. felis</i> , de coelho infectado com 10 ⁶ oocistos esporulados, referentes aos zero, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 DAI	31
Figura 15. Resultado do teste de ‘Western blotting’ em soro de coelhos, provenientes de propriedades da região serrana do estado Rio de Janeiro, infectados naturalmente. (PPM - Padrão de Peso Molecular, CP - Controle positivo, N - Negativo e 001 a 009 - Soro de coelhos oriundo de criações rústicas.).....	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comparação (μm) das medidas de oocistos esporulados de <i>Cystoisospora felis</i> registrados por diferentes autores.....	22
--	----

LISTA DE ANEXOS

- MEIRELES, G.S. DE; PAES-DE-ALMEIDA, E.C.; CARVALHO FILHO, P.R. DE; FLAUSINO, W.; RODRIGUES, J. DA S.; FERREIRA, A.M.R.; LOPES, C.W.G. Avaliação do intestino delgado e linfonodos mesentéricos de cães (*canis familiaris*) infectados experimentalmente com *Sarcocystis cruzi* (HASSELMAN, 1923) WENYON, 1926 (Apicomplexa: Sarcocystidae) *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 17, supl. 1, p. 00-00, 2008..... 46

SUMÁRIO

	Págs.
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	2
2.1 <i>Cystoisospora felis</i> (Wenyon, 1923) Frenkel, 1977: histórico e classificação taxionômica.....	2
2.1.1 Observações iniciais.....	2
2.1.2 O gênero <i>Isospora</i> Schneider, 1881.....	2
2.1.3 O gênero <i>Cystoisospora</i> Frenkel, 1977.....	3
2.2 <i>Cystoisospora felis</i> e seus hospedeiros definitivos.....	4
2.2.1 Espécies.....	4
2.2.2 Infecção, patogenia e patologia.....	4
2.3 <i>Cystoisospora felis</i> e seus hospedeiros intermediários.....	5
2.3.1 Espécies.....	5
2.3.2 Os estágios extra-intestinais de <i>Cystoisospora felis</i> nos hospedeiros intermediários... ..	6
2.4 Estudos sobre Biologia celular de espécies do gênero <i>Cystoisospora</i>	6
2.5 Epidemiologia e nuances epidemiológicas sobre o gênero <i>Cystoisospora</i>	8
2.6 Estudos de associação imunobiológica entre o gênero <i>Cystoisospora</i> e espécies da subfamília Sarcocystidae.....	9
3 MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1 Local de desenvolvimento do experimento.....	12
3.2 Animais utilizados na realização deste trabalho.....	12
3.3 Obtenção e seleção de oocistos esporulados de <i>Cystoisospora felis</i>	13
3.4 Purificação dos oocistos esporulados de <i>Cystoisospora felis</i>	13
3.5 Preparação, sonicação e dosagem de proteínas de oocistos esporulados de <i>Cystoisospora felis</i>	15
3.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) de sonicado de oocistos esporulados de <i>Cystoisospora felis</i>	17
3.7 Obtenção de soro heterólogo anti- <i>C. felis</i>	19
3.8 Transferência das proteínas de <i>Cystoisospora felis</i> do gel para o papel “ Western Blotting”.....	19
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1 Processo de isolamento e purificação de oocistos esporulados de <i>Cystoisospora felis</i>	22
4.2 Análise morfológica de oocistos de <i>Cystoisospora felis</i>	22
4.3 Complexos protéicos obtidos de oocistos de <i>C. felis</i> esporulados através de SDS-PAGE a 10%.....	25
4.4 Complexos protéicos de oocistos esporulados de <i>C. felis</i> obtidos através de SDS-PAGE a 12%.....	28
4.5 Resultados do teste de imunodeteção em situação experimental	31
4.6 Resultados do teste de imunodeteção em condição de infecção natural.....	32
5 CONCLUSÕES	34
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

RESUMO

MEIRELES, Gisele Santos de. **Utilização da técnica de ‘western blotting’ para diagnóstico da infecção por *Cystoisospora felis* (Wenyon, 1923) Frenkel, 1977 (apicomplexa: Cystoisosporinae) em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*).** 2009. 53p. Dissertação (Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2009.

Este trabalho teve por objetivo, traçar um perfil protéico de oocistos esporulados de *Cystoisospora felis*, recuperados a partir do uso seqüencial de várias técnicas de purificação adaptadas para o uso em oocistos esporulados de *C. felis*. Com o auxílio do SDS-PAGE a 10 e 12 % resultou na identificação de 22 grupos protéicos de 26; 29; 31; 36; 44; 50; 56; 62; 73; 77,55; 85,34; 97,62; 98,66; 101,24; 104,21; 109,23; 110,56; 113,21; 138,48; 180,50; 206,81 e 244,51 KDa, pertencentes a estrutura dos oocistos esporulados e esporozoítas de *C. felis*. Com base nesse resultado e em soro de coelho heterólogo anti-*C. felis* foi possível desenvolver uma técnica de diagnóstico imunoenzimático com “western Blotting” para identificação de animais infectados de maneira natural ou experimental com *C. felis*, identificando os seguintes proteínas antigênicas: p39.39; p42.18; p44.40; p47.82; p55.46; p58.75; p66.08; p77.41; p92.85; p99.58; p104.10; p112.84; p203.15 e p37.25; p38.80; p67; p69; p77; p93; p99; p103; p111.19; p202.66 KDa, respectivamente.

Palavras chave: *Cystoisospora felis*; Técnicas de purificação; SDS-PAGE; Western Blotting.

ABSTRACT

MEIRELES, Gisele Santos de. **The use of Western Blotting technique to determine *Cystoisospora felis* (Wenyon, 1923) Frenkel, 1977 (Apicomplexa: Cystoisosporinae) infection in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*).** 2009. 53p. Dissertation (Master in Veterinary Science in Veterinary Parasitology) Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2009.

This work aimed, to determine the phenotypic analysis from sporulated oocysts of *Cystoisospora felis* by using a sequential method of cleaning techniques. By using SDS-PAGE at 10 and 12 % were separated 22 protein groups as: 26.65; 29.71; 31.79; 36.41; 44.03; 50.09; 56.08; 62.64; 73.65; 77.55; 85.34; 97.62; 98.66; 101.24; 104.21; 109.23; 110.56; 113.21; 138.48; 180.50; 206.81 and 244.51KDa belonged to estrustructure from *C. felis* sporulated oocysts. Western Blotting technique was performed after SDS-PAGE and were identified these antigenic proteins: p39.39; p42.18; p44.40; p47.82; p55.46; p58.75; p66.08; p77.41; p92.85; p99.58; p104.10; p112.84; p203.15 and p37.25; p38.80; p67; p69; p77; p93; p99; p103; p111.19; p202.66 KDa from hyperimmune and natural infected rabbits by *C. Felis* respectively.

Keywords: *Cystoisospora felis*, Western Blotting, purification techniques, SDS-PAGE

1 INTRODUÇÃO

A família Sarcocystidea Poche, 1913 é uma das famílias mais estudadas da subordem Eimeriorina Leger, 1911, na qual estão incluídos indivíduos unicelulares do filo Apicomplexa, coccídios parasitas do intestino delgado. A família Sarcocystidea tem como peculiaridade de seu ciclo reprodutivo, ser heteroxeno obrigatório ou facultativo, onde ocorre relação de presa-predador entre os hospedeiros definitivos e intermediários para o fechamento do ciclo. As formas encontradas nos hospedeiros intermediários são apenas proliferativas ou de desenvolvimento trófico.

Tradicionalmente esta família abrange espécies bem estudadas e sendo o gênero *Cystoisospora*, um dos mais recentemente inclusos na família Sarcocystidea, tendo sido descritos no final da década de 1970. *Cystoisospora felis* é um dos coccídios mais comumente encontrado nas fezes de felinos domésticos (AMARAL et al.,1966) sendo facilmente visualizados devido ao seu tamanho e seu quadro clínico está associado a diarreia e desidratação (LOSS; LOPES,1992).

Existem poucos artigos sobre características antigênicas e sobre a resposta imunológica em seus hospedeiros intermediários , contudo são baseados em resposta obtidas a sensibilização com oocistos. Sendo por isso, a inter-relação, fenotípica e até genotípica das espécies deste gênero com as demais espécies da família pouco conhecida.

Assim, o presente trabalho teve por objetivo traçar o perfil protéico da estrutura completa de oocistos esporulados de *C. felis*, recuperados a partir de técnicas de purificação adaptadas a esta espécie, com o auxílio da eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS a 10 e 12% e padronizar uma técnica de diagnóstico de “Western Blotting” para identificação de animais infectados de maneira experimental ou natural com *C. felis*, proporcionando uma análise fenotípica da espécie-tipo do gênero *Cystoisospora*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Cystoisospora felis* (Wenyon, 1923) Frenkel, 1977: histórico e classificação taxionômica

2.1.1 Observações iniciais

O coccídio intestinal *C. felis* já foi alocado inúmeras vezes entre diferentes táxons da árvore taxionômica zoológica desde a sua primeira observação até o presente. Até hoje, a sua denominação como tal é controversa. No entanto, fortes evidências morfológicas e moleculares, além das biológicas, têm pesado sobre as antigas classificações muitas vezes ainda utilizadas.

A espécie *C. felis* remonta dos primeiros achados de formas ovóides nas fezes de cães e gatos, as então chamadas psorospermas oviformes ou coccídios. Nesse tempo, tinha-se a idéia de que cães e gatos compartilhavam as mesmas espécies de coccídios, podendo infectar seus respectivos tratos gastrointestinais. Assim, *C. felis* baseia-se em estudos anteriores sobre *Coccidium rivolta* do gato e acerca de *C. bigeminum* do cão, e sobre *Diplospora bigemina*. Já a descrição da espécie *C. rivolta* do gato doméstico que foi redenominada como *Isoospora rivolta* a partir da criação do gênero *Isoospora*, em 1881. Por um momento foi confundido com outro coccídio, *C. rivolta*, por possuir mensurações similares a futura espécie *I. felis*. Porém, pelo fato de considerar as formas como pleomorfismo da espécie por ele descrita, *D. bigemina*, Wasielewski faz com que o seu achado se torne *nomen nudum* (WENYON, 1923).

A evidência de que cães e gatos compartilhassem mesmas espécies de *Isoospora* começou a ser desconsiderada a partir do trabalho de NEMESÈRI (1960), onde foi observada a especificidade de *I. felis* para felídeos, dando subsídios para a criação da espécie *I. canis*, que compartilha semelhanças morfométricas com a anterior, porém com forma de oocisto ovóide.

2.1.2 O gênero *Isoospora* Schneider, 1881

O gênero *Isoospora* foi descrito por Duszynski (2004) para englobar os coccídios intestinais de invertebrados e vertebrados que possuíssem oocistos dispóricos tetrazóicos, tendo como espécie-tipo *I. rara*. No entanto, como inicialmente não se conhecia a capacidade de *I. bigemina*, *I. felis* (WENYON, 1923) e outras espécies de coccídios de carnívoros e onívoros em ter hospedeiros intermediários em seu ciclo biológico, o gênero *Isoospora* passou a ser considerado como por espécies com hospedeiros homoxenos e transmissão feco-oral obrigatória. Assim, espécies de *Isoospora* de aves passeriformes como *I. serini* e *I. canaria* de *Serinus canarius* (canário doméstico) e outras tantas foram facilmente incorporadas a este gênero, mesmo tendo diversas diferenças biológicas e morfológicas entre si. A presença de corpo de Stieda nos esporocistos de espécies de *Isoospora* de passeriformes, inicialmente, não foi de grande peso para criação de um novo gênero para elas (BOX, 1977, BOX, 1981). Contudo, atualmente para as espécies do gênero *Isoospora*, o uso da descrição do corpo de Stieda e/ou substieda seria uma das principais características morfológicas usadas para se enquadrar novas espécies encontradas, a exemplo do trabalho realizado por Berto et al. (2008) onde fez a descrição de *I. hemidactyli*

encontrado nas fezes da lagartixa doméstica *Hemidactylus mabouia*, muito comum em residências.

Entretanto, como a espécie-tipo é *I. rara*, coccídio homoxeno dos moluscos gastrópodes *Limax cinereoniger* e *L. griseus*, com oocistos dispóricos tetrazóicos, a descoberta de que as espécies de *Isospora* de cães e gatos possuíam ciclo heteroxeno facultativo fez com que fosse necessário incluí-las em um novo gênero. Questiona-se atualmente o fato de se ter como espécie-tipo do gênero *Isospora*, *I. rara*, já que esta espécie é a única a ter sido observada em hospedeiros invertebrados, podendo possivelmente se tratar de um pseudoparasita (TENTER et al., 2002). Sendo assim, passaram a permanecer neste gênero coccídios que tenham em seus esporocistos corpo de Stieda, em quanto os que tenham fraturas no esporocisto em substituição ao corpo de Stieda passaram para o gênero *Cystoisospora*.

2.1.3 O gênero *Cystoisospora* Frenkel, 1977

Entre 1972 e 1979, uma série de estudos foi conduzida, tendo como resultado marcante a descoberta da capacidade de *I. felis* e *I. rivolta* em formar cistos monozóicos em hospedeiros intermediários, em especial, nos linfonodos mesentéricos de roedores (FRENKEL; DUBEY, 1972, DUBEY; FRENKEL, 1972, DUBEY, 1979). Frenkel, em 1977, aproveitando os resultados obtidos, incluiu-as em um novo gênero, *Cystoisospora*, alocando nele as espécies encontradas em cães e gatos, a respeito das quais, até aquele momento, já se conhecia a capacidade em formar cistos monozóicos em hospedeiros intermediários e de transmitir o parasito para seus hospedeiros definitivos. Outro detalhe que chama atenção é a ausência de corpo de Stieda nos esporocistos de oocistos de espécies do gênero *Cystoisospora*, que os aproxima das espécies da família Sarcocystieda por ter fraturas do esporocisto a semelhança de outros gêneros desta família.

Além das espécies de *Cystoisospora* de cães e gatos, oocistos deste gênero já foram identificados em outras duas espécies de vertebrados: *C. israeli*, parasita intestinal da foca peluda sul-africana (*Arctocephalus pusillus*) (KUTTIN; KALLER, 1992) e *C. delphini*, do golfinho nariz-de-garrafa (*Tursiops truncatus*) (KUTTIN; KALLER, 1996). Em ambos hospedeiros, tais espécies de coccídios foram identificadas causando enterite.

Atualmente, *I. belli*, conhecido agente causal de isosporose humana, comum em indivíduos jovens não portadores de imunidade ativa ou imunocomprometidos, teve proposta para ser alocado taxionomicamente no gênero *Cystoisospora*, levando a mudança da família Eimeriidae para Sarcocystieda. Esse fato se deve a terem sido encontrados cistos monozóicos em linfonodos mesentéricos de humanos portadores de Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) (FRENKEL et al., 2003, FRENKEL; SMITH, 2003). Tal proposta vem a corroborar com as demais características fenotípicas como, por exemplo, ausência de corpo de Stieda nos esporocistos de *I. belli*, a despeito das demais espécies da família Sarcocystieda.

Com o advento da reação em cadeia da polimerase (PCR) e seu uso em questões taxionômicas, tornou-se possível confirmarem-se evidências lançadas pelos achados fenotípicos evidenciados por Frenkel (1977). Nesse ponto, algumas espécies dos gêneros *Cystoisospora* e *Isospora* (*C. felis*, *C. ohioensis* e *I. suis*) foram, há alguns anos, avaliadas a partir da clonagem e sequenciamento do gene transcritor da subunidade 18S do RNAr, sendo possível confirmar evidências prévias de que tais coccídios possuam características afins que fazem com que os mesmos devam ser inseridos na família Sarcocystieda em vez da família Eimeriidae (CARRENO et al., 1998).

Desse modo, utilizando-se a classificação mais recente, porém não consensual, *C. felis* se encontra alocada, seguindo as classificações de Frenkel (1977), Smith (1981) e Corliss (1994):

Império: Eukaryota Corliss, 1994
Reino: Protozoa Goldfuss, 1818
Filo: Apicomplexa Levine, 1970
Classe: Sporozoea Leuckart, 1879
Subclasse: Coccidia Leuckart, 1879
Ordem: Eucoccidiidae Leger e Duboscq, 1910
Subordem: Eimeriorina Leger, 1911
Família: Sarcocystida Poche, 1913
Subfamília: Cystoisosporinae Smith, 1981
Gênero: *Cystoisospora* Frenkel, 1977
Espécie: *Cystoisospora felis* (Wenyon, 1923) Frenkel, 1977

2.2 *Cystoisospora felis* e seus hospedeiros definitivos

2.2.1 Espécies

Em todos os trabalhos executados até a descrição de *C. felis* por Wenyon (1923), tal coccídio sempre foi associado às fezes de gatos domésticos (*Felis catus*), vindo a ser este o hospedeiro-tipo da espécie. Entretanto, diversas espécies de felídeos são atualmente consideradas como passíveis de se infectar com este parasito, sendo descrito na literatura a onça-pintada (*Panthera onca*) (BARRETTO; ALMEIDA, 1937), a suçuarana (*Puma concolor*) (AMARAL et al., 1966), o leopardo (*P. pardus*), tigres (*P. tigris*), o leopardo nublado (*Neofelis nebulosa*) (PATTON ; RABINOWITZ, 1994), o gato-selvagem-europeu (*F. silvestris*), a jaguatirica (*Leopardus pardalis*), o serval (*Leptailurus serval*), o lince (*Lynx lynx*), o leão (*P. leo*), o tigre (*P. tigris*) e o gato-leopardo (*Prionailurus bengalensis*) (DUSZYNSKI et al., 2000).

2.2.2 Infecção, patogenicidade e patologia

Como de característica de todos os coccídios da subfamília Cystoisosporinae, *C. felis* pode infectar felídeos a partir da ingestão de oocistos esporulados contendo esporozoítas viáveis ou por vísceras de hospedeiros intermediários com formas de resistência tecidual, neste caso, os hipnozoítas (SMITH, 1981).

Os oocistos de *C. felis* são eliminados nas fezes na forma não esporulada, a exemplo dos indivíduos da subfamília Toxoplasmatinae e Cystoisosporinae, tornando-se esporulados em condições ótimas de temperatura, umidade e oxigenação em um período médio de 48 horas após contato com o meio ambiente (SHAH, 1971). Posteriormente à ingestão de oocistos esporulados ou de cistos de *C. felis*, o parasito multiplica-se extensivamente no intestino delgado dos felinos, produzindo três gerações merogônicas e uma gametogônica (SHAH, 1971). De acordo com Hitchcock (1955), apenas duas gerações de merontes se desenvolveriam no epitélio intestinal de felinos infectados por *C. felis*. A terceira geração de merontes identificada por Shah (1971) é similar à segunda identificada por Hitchcock (1955). Shah (1971) observou, entre as duas gerações identificadas previamente por Hitchcock (1955), uma forma merogônica que seria

originada sem a exteriorização dos merozoítas de segunda geração à luz intestinal e que sofreria multiplicação por processo de endopoligenia.

Entretanto, estudos ultraestruturais posteriores mostraram que nas merogonias iniciais, ao sexto dia de infecção com oocistos esporulados de *C. felis*, a divisão celular por endodiogenia foi predominante. Nesse processo, ocorre a formação de duas células-filha no interior da célula-mãe. No estágio inicial, a célula-mãe ainda possui organelas internas como róprias e micronemas e cada célula-filha consiste em uma membrana em forma de redoma com microtúbulos presentes. O desenvolvimento foi pelo crescimento de tais complexos para envolver áreas do citoplasma contendo organelas internas dos merozoítas. Nos estágios finais de desenvolvimento, os complexos de membrana formam uma película interna que delimita as duas células-filha maduras. Além disto, foi observado que estas células-filha poderiam desenvolver futuras endodiogenias no interior do mesmo vacúolo parasitóforo (FERGUSON et al., 1980). O processo de endogenia observado no intestino delgado de gatos infectados foi similar ao descrito em endozoítas de *T. gondii* (OGINO; YONEDA, 1966; SHEFFIELD; MELTON, 1968) e de cistozoítas de membros da família Sarcocystieda que formam cistos polizóicos (SCHOLTYSECK, 1973).

Em gatos, a infecção por *C. felis* é vista como sendo brandamente patogênica, acometendo principalmente animais jovens. Os sinais clínicos são discretos, sendo caracterizados por diarreia com traços de muco e desidratação (SHAH, 1971, LOSS; LOPES, 1992a). Ao infectar felinos jovens com 10^5 oocistos de *C. felis*, Hitchcock (1955) não conseguiu reproduzir os sintomas de enterite, desidratação e diarreia. Tomimura (1957) verificou severa diarreia, anorexia, anemia, emagrecimento, moderada elevação da temperatura e perda de peso em filhotes, de quatro a sete dias após infecção com 10^5 oocistos esporulados. As lesões macroscópicas são inexistentes, entretanto, à histopatologia, observa-se destruição do epitélio superficial do intestino delgado, em especial do íleo, hiperemia da lâmina própria, infiltrado neutrofílico moderado e hipersecreção por parte da mucosa (SHAH, 1971).

Não há evidências concretas da existência de uma relação direta entre doenças imunossupressoras como a síndrome da imunodeficiência felina e a leucemia viral felina, a eliminação de oocistos de *T. gondii*, *C. felis* ou *C. rivolta* nas fezes de gatos (LIN et al., 1990).

2.3 *Cystoisospora felis* e seus hospedeiros intermediários

2.3.1 Espécies

No início da década de 1970, observou-se que *C. felis* tinha a capacidade de infectar hospedeiros não-felinos e de ser transmitido à felídeos através do carnivorismo. Desde essa época até o momento atual, têm-se como possíveis hospedeiros intermediários de espécies de *Cystoisospora* camundongos, ratos, hamsters (FRENKEL; DUBEY, 1972), cães (DUBEY, 1975), bovinos (FAYER; FRENKEL, 1979), pássaros (LINDSAY; BLAGBURN, 1994), coelhos (COSTA; LOPES, 1998), suínos (MELO et al., 2003, CARVALHO FILHO et al, 2003) e frangos (MASSAD et al., 2002). Gatos alimentados com amostras de musculatura da língua e do esôfago de camelos vieram a eliminar oocistos de *C. felis* e *C. rivolta*, entre oocistos e esporocistos de outros coccídios da família Sarcocystieda (HILALI et al., 1995). Contudo, longe se está de se considerar o camelo como sendo hospedeiro intermediário deste coccídio, já que se tratou de estudo onde o ciclo biológico do parasito não foi seguido com exatidão, não tendo sido seguidos os postulados de Koch, isto é, os camelos abatidos não tinham sido experimentalmente infectados.

2.3.2 Os estágios extra-intestinais de *Cystoisospora felis* nos hospedeiros intermediários

Os estágios extra-intestinais de *C. felis* foram estudadas por Markus (1978), sendo chamadas por ele de dormizoítas (*dormire*, latim – dormir e *zoon*, grego – animal). Tais formas se apresentam no interior de cistos monozóicos, ou seja, com apenas uma forma em seu interior que podem permanecer viáveis por 15 meses. O cisto monozóico de *C. felis* se caracteriza como sendo um vacúolo parasitóforo simples, sem a existência de uma parede cística (típica de cistos de *T. gondii*, por exemplo) e aderido a uma camada de material granular eletro-denso (MEHLHORN; MARKUS, 1976). A ingestão de vísceras contendo as formas de resistência extra-intestinais pelo hospedeiro definitivo faz com que o ciclo se processe como ocorreria com a ingestão de oocistos esporulados em período pré-patente ligeiramente menor do que com a infecção por oocistos (DUBEY; FRENKEL, 1972, FRENKEL; DUBEY, 1972).

O nome hipnozoítas foi sugerido por Levine (1985) para as mesmas formas previamente classificadas por Markus (1978). Desde então, o nome tem sido mais utilizado com referência a esta forma evolutiva, como já vinha sendo utilizado pelas formas hepáticas de resistência em espécies do gênero *Plasmodium* Marchiafava e Celli, 1885.

A distribuição corporal dos hipnozoítas nas diferentes vísceras avaliadas sugere um tropismo mais elevado pelas placas de Peyer, linfonodos mesentéricos, baço e fígado (FRENKEL; DUBEY, 1972, BRÖSIGKE et al., 1982, FREIRE; LOPES, 1996, COSTA; LOPES, 1998). Dubey (1979) observou que a musculatura esquelética de camundongos inoculados com oocistos de *C. rivolta* induzia a eliminação de oocistos deste coccídeo por gatos. Entretanto, o mesmo autor não identificou nenhuma forma do parasito na musculatura através de histopatologia ou impressão dos órgãos. Costa e Lopes (1998), utilizando a técnica de digestão péptica em tecidos de coelhos experimentalmente infectados com oocistos de *C. felis*, constataram a presença de hipnozoítas no fígado, baço, linfonodos mesentéricos e placas de Peyer, sem identificá-los na musculatura esquelética.

Na década de 1980, técnicas de digestão enzimática de tecidos possibilitaram observar e isolar hipnozoítas do interior das células parasitadas. A digestão triptica de tecidos foi uma das primeiras utilizadas para isolamento desta forma evolutiva (HEINE, 1981, BRÖSIGKE et al., 1982). Entretanto, a digestão triptica tende a causar maiores danos aos hipnozoítas e, com o advento da digestão péptica de tecidos, uma quantidade maior de formas extra-intestinais pôde ser recuperada e isolada de tecidos de hospedeiros intermediários (FREIRE; LOPES, 1996, DUBEY, 1998, COSTA; LOPES, 1998, OLIVEIRA et al., 2001).

Cystoisospora felis pode ser considerada muito patogênica a camundongos neonatos. Estes, quando inoculados por via intraperitoneal com 10^3 esporozoítas de *C. felis*, podem causar a morte de 100% dos animais em apenas quatro dias. Por outro lado, quando 10^6 macrófagos de peritônio de camundongos adultos pré-inoculados com esporozoítas de *C. felis* foram inoculados em camundongos neonatos, todos os animais vieram a óbito 12 dias após inoculação (FREIRE; LOPES, 1995a), do mesmo modo que interfere no ganho de peso de camundongos infectados por via oral com oocistos esporulados (LOSS; LOPES, 1992b).

2.4 Estudos sobre biologia celular de espécies do gênero *Cystoisospora*

O cultivo de espécies do gênero *Cystoisospora* foi tentado por diversos autores. Muitos deles fracassaram em suas tentativas como, por exemplo, Sheffield e Melton (1972) em cultivos de esporozoítas de *C. rivolta* em células de rim de macacos e Shibalova e Petrenko (1972) que

testaram diversos tipos celulares, entre eles, cultivos primários de células de embrião de galinha e codorna, cultivo secundários de células de rim de macaco, embriões humano, leporino e ovino, de macaco verde e células amnióticas de humanos. Fayer (1972) obteve êxito em cultivar esporozoítas de *C. rivolta* em células de rim felino, de rim fetal bovino e células de rim canino Madin-Darby. Entretanto, o cultivo continuado de esporozoítas nesses tipos celulares não foi possível, e as formas se degeneraram poucos dias após o início. Fayer e Thompson (1974) utilizaram cultivos de células humanas (intestinais de embrião, epitélio esofágico, células amniônicas, pulmonares, HeLa – carcinoma epitelial de cérvix), assim como células traqueais bovinas, de rim de cães e de frangos para avaliar o desenvolvimento de estágios de *C. felis* nestas células. Todas as células foram aptas a propiciar o desenvolvimento de zoítas de *C. felis*. Observou-se desenvolvimento de células-filhas multiplicadas através de endodiogenia e possivelmente por esquizogonia. Entretanto, estes estágios não se mantiveram continuamente em cultivos. Os corpos refráteis dos zoítas foram corados utilizando-se a coloração policrômica de Whipf. Esses autores observaram que, assim como os esporozoítas, os outros zoítas tinham os corpos refráteis corados no momento da penetração ativa nas células hospedeiras e após a saída, na geração seguinte. Durante o processo de multiplicação dos zoítas, os corpos refráteis não se coravam. Através da coloração por Ácido Periódico de Schiff (PAS), a mesma observação, quanto aos corpos refráteis, deu-se em relação ao acúmulo de carboidratos que aumentou até o momento da saída da célula e à diminuição durante a endodiogenia.

Diversos estágios de vida de *C. felis* foram observados em cultivos de esporozoítas na membrana corioalantóica (MCA) de ovos embrionados de galinha. Os ovos, tendo sido tratados ou não com acetato de cortisona ao momento da inoculação do esporozoítas, apresentaram três gerações de merontes e uma gametogonia na MCA, à semelhança do que ocorre no ciclo natural, no intestino delgado de felídeos. A formação de oocistos na MCA também foi observada, assim como o desenvolvimento de merontes no fígado e intestino delgado de embriões tratados com acetato de cortisona (GUTIÉRREZ; ARCAÏ, 1987).

O poder invasivo de esporozoítas e merozoítas de *C. felis* em células de peritônio de ratos, impossibilitadas de desenvolver fagocitose, foi comparado, sendo os primeiros os mais invasivos, possivelmente por ter a necessidade de se deslocar por uma distância muito grande até encontrar o sítio apropriado para seu desenvolvimento. Já o merozoíta não teria a necessidade de um poder invasivo tão grande por se encontrar próximo a células com condições de se servirem destas para seu desenvolvimento (TEJERO; ARCAÏ-DE-PERAZA, 1982).

Em estudo ultraestrutural sobre hipnozoítas albergados em linfonodos mesentéricos de camundongos experimentalmente infectados com oocistos de *C. felis*, observou-se que tal forma apresentava película típica de coccídios, contendo três camadas: a interna, interrompida apenas nos pólos apicais e anti-apicais e nos micropóros; enquanto as outras duas camadas permaneciam contínuas por toda a extensão do zoíta. Os microtúbulos se estendem desde o anel polar apical por até dois terços do comprimento da célula. Outras estruturas que chamaram a atenção neste estudo foram um corpo cristalóide localizado logo abaixo do núcleo da célula e inúmeros grânulos de polissacarídeos de característica eletropálido, os quais foram definidos como grânulos de amilopectina. Os hipnozoítas estavam sempre envoltos por um vacúolo parasitóforo composto por apenas uma membrana sem a formação de uma parede cística, a exemplo de *T. gondii*. Muitos dos vacúolos parasitóforos tinham inúmeros grânulos eletrodensos na porção externa da membrana e na sua face interna, uma grossa camada de material granular eletropálido (MEHLHORN; MARKUS, 1976). Os referidos autores consideraram a presença de corpos cristalóides, estrutura típica de esporozoítas, não observados em zoítas extra-intestinais, como uma evidência mais contundente de que estas formas não entravam em processo de endogenia,

mesmo que em longo prazo. Desse modo, os hipnozoítas poderiam ser vistos como formas não totalmente desenvolvidas de cistozoítas, ou ainda um estágio de resistência ou espera, até que ele tivesse a oportunidade de fechar o seu ciclo de vida.

Outros trabalhos sobre os coccídios do gênero *Cystoisospora* é o excistamento de esporozoítas, em especial para realização de trabalhos imunológicos ou moleculares. O excistamento é uma vertente bem estudada em espécies da família Eimeriidae, especialmente pela ausência de formas extra-intestinais no ciclo biológico desses coccídios. No gênero *Cystoisospora*, apesar de estar alocado na família Sarcocystida, a presença de poucas formas extra-intestinais em cistos monozóicos inviabiliza a obtenção de cistozoítas ou taquizoítas como para demais gêneros da família Sarcocystida. A obtenção de esporozoítas livres é um importante passo para realização de trabalhos imunológicos e biomoleculares, já que as formas teciduais de *C. felis* não são isoladas em grandes quantidades. Poucos trabalhos foram realizados com excistamento de esporozoítas de espécies do gênero *Cystoisospora*. Em estudos desenvolvidos por McKenna e Charleston (1982), os mesmos observaram que o pré-tratamento com solução de hipoclorito de sódio e o uso de solução de excistamento contendo bile e tripsina levou a resultados em torno de 80% de liberação de esporozoítas.

2.5 Epidemiologia do gênero *Cystoisospora*

Diferente de alguns coccídios da família Sarcocystida, como *Neospora caninum* Dubey et al., 1988 e *T. gondii* Nicolle e Manceaux, 1909 (BARBER; TREES, 1998, DUBEY; FRENKEL, 1998, HIETALA; THURMOND, 1999), *C. felis*, assim como *C. rivolta* não são transmitidos congenitamente em infecções crônicas, através da barreira transplacentária (DUBEY, 1977). Mesmo sem utilizar esta estratégia epidemiológica, as espécies do gênero *Cystoisospora* apresentam alta dispersão entre os hospedeiros definitivos.

Nichol et al. (1981), ao avaliarem os parasitos encontrados nas fezes de 92 gatos ferais provenientes de cinco regiões da Inglaterra, encontraram 4,3% de positividade para *C. felis*. Em nenhuma das amostras de fezes estudadas foram encontrados oocistos de outro coccídio.

Em 96 amostras de fezes coletadas de gatos em clínicas veterinárias particulares, hospitais-escola e vários criadores de Taiwan (Formosa), 3,1% das amostras foram positivas para *C. felis* e 5,2% para *C. rivolta* (LIN et al., 1990). Quando em um estudo epidemiológico não-aleatório foram analisadas fezes de gatos de rua oriundos de várias áreas da Bélgica, a frequência de animais positivos para coccídios do gênero *Cystoisospora* foi de 30%, sendo 10% dos exames positivos para *C. rivolta* e 20% positivo para *C. felis* (VANPARIJS et al., 1991), no entanto, não se deve esquecer de que, nesse estudo, apenas uma coleta de material foi feita, diminuindo em muito a chance de se encontrar o parasito, já que o animal teve de se encontrar em plena patência para ser considerado positivo.

Outro estudo sobre inquérito parasitológico em gatos de Hannover e suas imediações, na Alemanha, 932 amostras de fezes, 505 de gatos da área urbana e 427 da área rural foram pesquisadas, tendo sido observado em 2,0% das amostras oocistos de *C. rivolta* (1,0% na área urbana e 3,3% na área rural) e em 1,9% oocistos de *C. felis* (1,8% na área urbana e 2.1% na área rural) (MUNDHENKE; DAUGSCHIES, 1999). Um estudo anterior realizado em três cidades da Alemanha, na região da Turingia e da Saxônia, revelou resultados muito diferentes dos encontrados posteriormente em Hannover. Neste, oocistos de *C. felis*, *C. rivolta* e *T. gondii* estavam presentes respectivamente em 17%, 13% e 3,6% das análises fecais realizadas em um total de 111 gatos não-domiciliados (RASCHKA et al., 1994). Observa-se que as frequências de tais coccídios nas fezes de felinos domésticos variam em muito, mesmo em se tratando de regiões

próximas umas das outras, possivelmente estando relacionado ao tipo de hospedeiro intermediário predado.

Gennari et al. (1999) analisaram 187 amostras de fezes de gatos de diferentes idades, domiciliados, porém sendo a maioria deles com livre acesso à rua, durante os anos de 1991 a 1995, tendo como universo, diferentes regiões da cidade de São Paulo. A presença de endoparasitos nas amostras fecais foi contabilizada em sendo de 95,72%. Oocistos de *Cystoisospora* foram os mais freqüentes, presentes em 38,5% das amostras avaliadas. É claro que o presente trabalho não reflete a realidade da ocorrência de oocistos de coccídios do gênero *Cystoisospora* em fezes felinas, porém dá um forte indicativo da ocorrência deste protozoário na classe de felinos (domiciliados com livre acesso à rua).

Um estudo realizado no município de Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, mostrou que 42,42% dos gatos errantes capturados pelo Serviço de Controle de Zoonoses local nos três primeiros meses de 2002 (14 em 33 animais), estavam em plena eliminação de oocistos de *C. felis* ou entrariam em eliminação nos 15 dias sucedidos à captura. Os autores concluíram que o estresse da captura sofrido pelos animais exacerbava a infecção pelo coccídio, reagudizando-a e levando a novo episódio de eliminação de oocistos (SANTOS et al., 2002).

Pelos motivos expostos, Dubey (1993) afirmou que praticamente todo gato extradomicializado iria, estava ou estaria eliminando oocistos do gênero *Cystoisospora*, de modo que, virtualmente, todo gato tornar-se-ia infectado por coccídios deste gênero, em especial, *C. felis*.

2.6 Estudos de associação imunobiológica entre o gênero *Cystoisospora* e espécies da subfamília Sarcocystidae

Poucos estudos imunológicos foram desenvolvidos utilizando-se *Cystoisospora* como foco. Nesses, espécies do gênero *Cystoisospora* e *T. gondii* se associam, podendo ocorrer reeliminações mútuas (DUBEY, 1976, OMATA et al., 1991a, OMATA et al., 1991b).

A superinfecção de gatos cronicamente infectados com oocistos esporulados de *C. felis* induz a reeliminação de oocistos de *T. gondii* em suas fezes (CHESSUM, 1972, DUBEY, 1976).

A partir do estudo de Omata et al. (1991a), foi possível observar a inter-relação imunogênica entre antígenos de *C. felis* e de *T. gondii*. A infecção oral de um gato livre de coccídios por 10^5 oocistos esporulados de *T. gondii* levou a eliminação de oocistos entre o 20° e o 26° DAI (dias após inoculação). Através da reação de imunofluorescência indireta (RIFI), foi possível observar um rápido aumento de anticorpos IgG anti-*T. gondii* no soro deste felino (na ordem de 1/4096). Quanto aos títulos de anticorpos anti-*C. felis*, estes foram observados na ordem de 1/4. Porém, após a infecção oral do mesmo gato com oocistos esporulados de *C. felis*, sete semanas após a primo infecção com *T. gondii*, os títulos se elevaram para 1/64 em apenas 7 dias.

No mesmo estudo, a inoculação *per os* de oocistos esporulados de *T. gondii* em gatos naturalmente infectados e em processo de eliminação intermitente de oocistos de *C. felis* promoveu um rápido aumento de títulos de anticorpos anti-*C. felis* (1/4096) e anti-*T. gondii* (1/64). Mesmo com altos títulos de anticorpos IgG anti-*C. felis* no soro, os gatos deste ensaio eliminaram oocistos de *C. felis* poucos dias após o início da eliminação de oocistos de *T. gondii* nas fezes.

Cistos de *T. gondii* também induziram uma elevação dos títulos de anticorpos IgG anti-*C. felis* em torno de sete dias após a inoculação oral. Dessa vez, reeliminação de oocistos de *C. felis* não foi observada, já que esse felino também apresentava eliminação intermitente de oocistos de *C. felis* pelo menos quatro semanas antes da inoculação dos cistos.

A inoculação intramuscular tripla de taquizoítas de *T. gondii* conjugados aos adjuvantes (completo e incompleto) de Freund em intervalos de três semanas entre as aplicações, fez com que os títulos de anticorpos anti-*T. gondii* e anti-*C. felis* aumentassem prontamente no soro de gatos em eliminação intermitente de oocistos de *C. felis*. No entanto, foi ineficaz em impedir a eliminação de oocistos de *T. gondii* e *C. felis* nas fezes após a inoculação oral de cistos de *T. gondii* (OMATA et al., 1991a).

Tal estudo mostrou que, mesmo levando a aumento simultâneo de anticorpos IgG anti-*C. felis* e anti-*T. gondii*, a infecção por oocistos, cistos e taquizoítas de *T. gondii* foi capaz em induzir reeliminação de oocistos de *T. gondii* e algumas vezes de oocistos de *C. felis*. Essa reeliminação se deu mesmo quando se observara altos títulos de anticorpos IgG anti-*T. gondii* e anti-*C. felis*.

Taylor et al. (1990) identificaram o complexo apical como sendo uma região antigenicamente semelhante entre muitos protozoários coccídios. No entanto, antígenos dispersos por todo o parasito também puderam ser identificados em reação cruzada para amostras séricas contendo IgG anti-*T. gondii* e anti-*C. felis*, evidenciando que não apenas o complexo apical detém antígenos ancestralmente similares entre as espécies de coccídios (OMATA et al., 1991b).

Poucos estudos abordam as características fenotípicas e antigênicas sobre espécies do gênero *Cystoisospora*. O único trabalho realizado identificou um grupo protéico com 22 KDa de peso molecular específico para *C. felis* através de “imunoblotting” com soro felino positivo para IgG anti-*C. felis* (OMATA et al., 1991b). Entretanto, não se sabe se essa especificidade é absoluta ou se em outras espécies do gênero *Cystoisospora*, podem ser identificadas por tal grupo antigênico.

Diferentemente da falta de estudos sobre espécies da subfamília Cystoisosporinae, são abundantes as informações a respeito da subfamília Toxoplasmatinae.

Com o advento da reação em cadeia da polimerase e seu uso para o esclarecimento em questões taxionômicas, torna-se possível confirmar evidências lançadas pelos achados fenotípicos em estudos posteriores. Neste ponto, algumas espécies dos gêneros *Cystoisospora* (*C. felis*, *C. ohioensis*, *C. suis* e *C. belli*) foram, há alguns anos, avaliadas a partir da clonagem e sequenciamento do gene transcritor da subunidade 18S do RNAr (CARRENO et al., 1998; FRAZEN et al., 2000) e a partir do sequenciamento total realizado por Samarasinghe et al. (2008) do gene ITS1 do RNAr de algumas espécies deste mesmo gênero (*C. felis*, *C. rivolta*, *C. ohioensis-like*, *C. suis*, *C. belli*, *T. gondii*, *N. caninum*, *Sarcocystis* e *Eimeria* spp.) foi possível desenvolver um PCR específico para rápida identificação das espécies do gênero *Cystoisospora*. Possibilitando demonstrar uma proximidade genética com *T. gondii* e *N. caninum*. Constituindo assim, um clade grupo irmão de *Sarcocystis* spp. (Figura 1). Com estes novos dados torna-se possível confirmar, estudos prévios (FRENKEL, 1977) que tais coccídios possuem características que fazem com que sejam mais corretamente inseridos na família Sarcocystidae ao invés da família Eimeriidae.

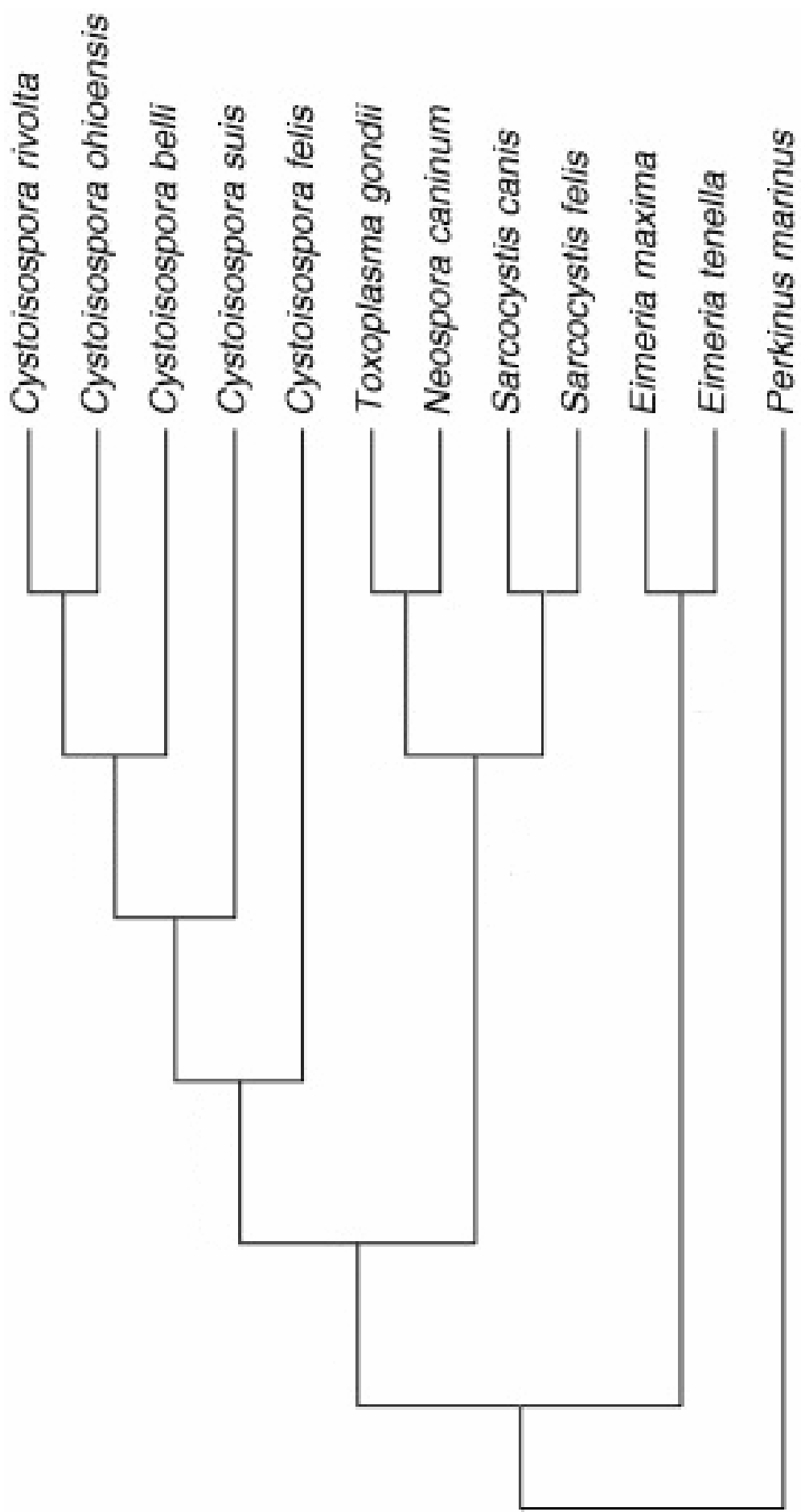


Figura 1 – Relação filogenética entre espécies do género *Cystoisospora* e outros coccídios, baseada pela análise do gene transdutor ITS1 do RNAr, de acordo com SAMARASINGHE et al. (2008)

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de desenvolvimento do experimento

O desenvolvimento do experimento foi todo realizado no laboratório de laboratório de Coccídios e coccidioses (LCC) do Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), situado no prédio de Sanidade Animal (EMBRAPA/UFRuralRJ),

Os animais experimentais foram mantidos, isolados em gaiolas individuais dentro de uma baía que, previamente, teve o piso e paredes lavadas com hipoclorito de sódio a 5%. As gaiolas antes de serem utilizadas foram deixadas de molho durante 24 horas em hipoclorito de sódio na mesma concentração utilizada para lavagem das baias. Todo o complexo, baía e gaiolas, foram flambadas utilizando-se um maçarico acoplado a um botijão de gás (vassoura de fogo). As gaiolas foram mantidas suspensas e separadas umas das outras de maneira a não haver possibilidade de contato entre os animais e possível contaminação.

3.2 Animais utilizados na realização deste trabalho

Uma gata jovem na sétima semana de prenhez foi colocada em uma gaiola dentro de uma baía tratada previamente, para evitar a contaminação dos animais. Entre o período de chegada da gata e o parto, foi realizado o tratamento preventivo com sulfadiazina e trimetoprima^a nas doses de 30 mg/kg e 6 mg/kg, respectivamente, por via intramuscular, uma vez ao dia durante 15 dias, à semelhança de Loss e Lopes (1997). Foi realizada também a vermifugação com pamoato de pirantel, praziquantel, febantel^b, um comprimido para cada 10 kg de peso, por via oral, em duas doses com intervalo de 15 dias entre elas. Durante e após o tratamento da gata, foram coletadas fezes, que foram submetidas à técnica de centrifugo-flutuação com solução saturada de açúcar de acordo com a metodologia de flutuação de Sheater (REESE et al., 1982) para confirmar ausência de oocistos.

Após o parto, continuou-se com os cuidados em relação a prevenção para evitar a contaminação ambiental e conseqüente contaminação dos filhotes. A prole, em número de cinco animais, foi mantida sob cuidado materno até o 45º dia de vida, período no qual ocorreu o óbito de três filhotes e o desmame e início da alimentação dos outros dois filhotes com ração seca^c. E em seguida, a mãe foi apartada dos filhotes. Para manter facilitada a higiene e a coleta de material das gaiolas, utilizou-se em cada uma delas caixa higiênica de poliestireno preenchida com granulado higiênico para gatos^d.

Na semana seguinte ao desmame dos filhotes, foram coletadas fezes da caixa higiênica diariamente e submetidas à técnica de centrifugo-flutuação em solução saturada de açúcar, e também foi realizada a vermifugação preventiva dos filhotes para eliminar as chances de uma contaminação via transplacentária ou via transmamária de quaisquer tipos de helmintos.

Para desenvolvimento da segunda etapa deste trabalho foram utilizados dois coelhos da raça Nova Zelândia branca, fêmeas, provenientes de uma criação tecnificada do Colégio Agrícola Nilo Peçanha - CANP/UFF, Pinheiral, Rio de Janeiro.

^aTribriessen®, Coopers Brasil Ltda., Cotia, SP.

^bVermotrix Plus, Jofadel Industria Farmacêutica S/A, Varginha, MG.

^cCat meal, Guabi, Campinas, SP.

^dMaz Cat, Embramil, SP.

3.3 Obtenção e seleção de oocistos esporulados de *Cystoisospora felis*

Um isolado puro de oocistos esporulados de *C. felis*, mantido no LCC, conservado sob refrigeração a 4°C, foi utilizado como fonte de inoculação dos filhotes livres de coccídios. Este isolado puro foi originado de gatos recém desmamados naturalmente infectados por *C. felis*, e vem sendo mantido através de infecções experimentais sucessivas para manter a viabilidade e infectividade do parasito. Neste caso, o isolado puro utilizado foi mantido durante um período de seis meses em solução salina de Hank (ANDRADE, 2000), para armazenamento adicionada de penicilina G e estreptomicina, na proporção de 100 U/ml e 10 mg/ml, respectivamente e anfotericina B, na proporção de 0,5 mg/ml. A solução de armazenamento dos oocistos, rica em antibióticos e antimicóticos, foi removida através de centrifugação em tubos cônicos de poliestireno com capacidade para 15 ml a uma força centrífuga (F.C.) de 1.500 G por 10 minutos a 10° C em centrífuga refrigerada^e e o sedimento rico em oocistos foi ressuscitado em solução de PBS pH 7,2, este processo foi executado mais duas vezes. Os oocistos de *C. felis*, uma vez livres da solução de armazenamento foram finalmente ressuscitados em solução de PBS pH 7,2 sendo quantificado o número de oocistos por volume de suspensão, verificada em câmara hemocitométrica, sendo possível determinando um volume de 10⁶ oocistos/ml. A suspensão final de oocistos esporulados foi o inóculo para os gatos livres de coccídios.

Os filhotes, com oito semanas de vida, foram inoculados por via oral com 1 ml da suspensão tamponada contendo 10⁶ oocistos esporulados de *C. felis*, diluído em leite próprio para alimentação animal^f. Depois da inoculação, exames fecais de acordo com a metodologia de Sheater (REESE et al., 1982) foram executados diariamente até o início da eliminação de oocistos, onde, a partir desse momento, as fezes passaram a ser coletadas integralmente, pesadas, diluídas em água destilada e filtradas em tamis com gaze dobrada duas vezes. A colheita foi executada durante o período de alta eliminação de oocistos, o que compreendeu em um intervalo de duas semanas. A suspensão fecal filtrada foi acondicionada em garrafas de poliestireno de um litro, adicionada de solução aquosa de dicromato de potássio a 2,5% em proporção de 1:2, e submetidas à aeração forçada por meio de bomba de aquário^f, durante um período de 15 dias, até que 80% dos oocistos se encontrassem esporulados.

Foi realizada uma análise da viabilidade dos oocistos encontrados nas fezes, do primeiro até o último dia de eliminação e foram selecionados, de acordo com esses dados (Figura 2), os dias com alta porcentagem de esporulação permitindo com isso, a recuperação de oocistos com maior número de estruturas integras.

3.4 Purificação dos oocistos esporulados de *Cystoisospora felis*

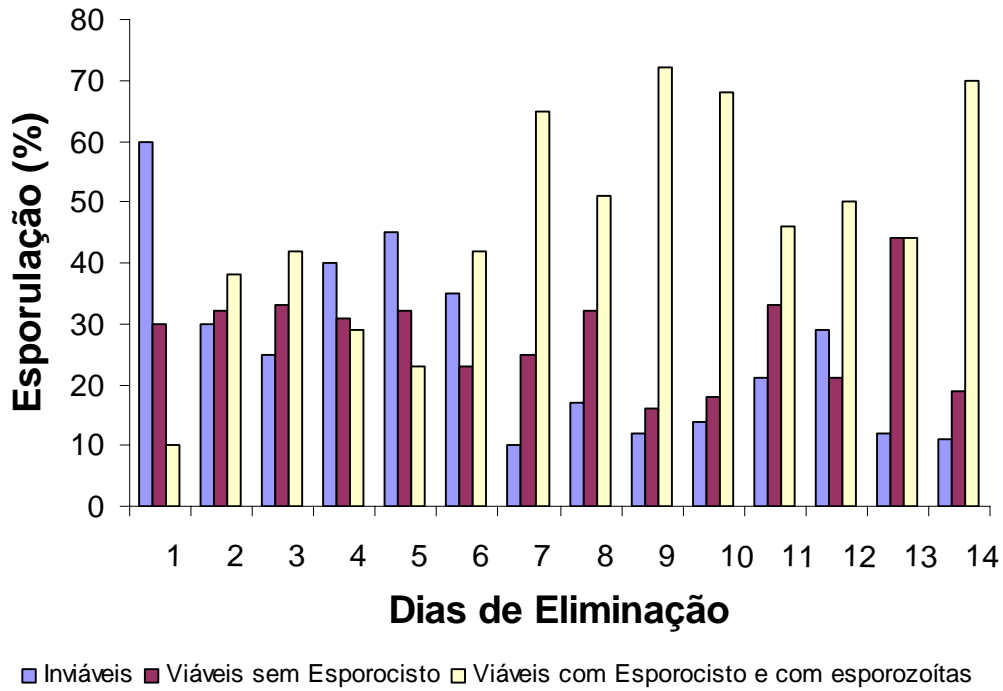
A purificação dos oocistos esporulados de *C. felis*, se iniciou pela remoção do dicromato de potássio a 2,5% da suspensão de oocistos através de centrifugação em frascos para centrífuga com tampa rosqueável de capacidade de 300 ml. Foi centrifugado a F.C. de 2.000 G por 10 minutos a 10° C. O sedimento foi ressuscitado e centrifugado em água destilada até que visualmente não se observassem mais traços de dicromato de potássio na suspensão.

^e RDE /Damon/IEC Division DPR 6000 Centrifuge, Massachusetts, EUA.

^f Pet Milk®, VETNIL IND., Louveira, SP.

^f Aqualife 100, 110V., São Paulo, SP.

Gato I



Gato II

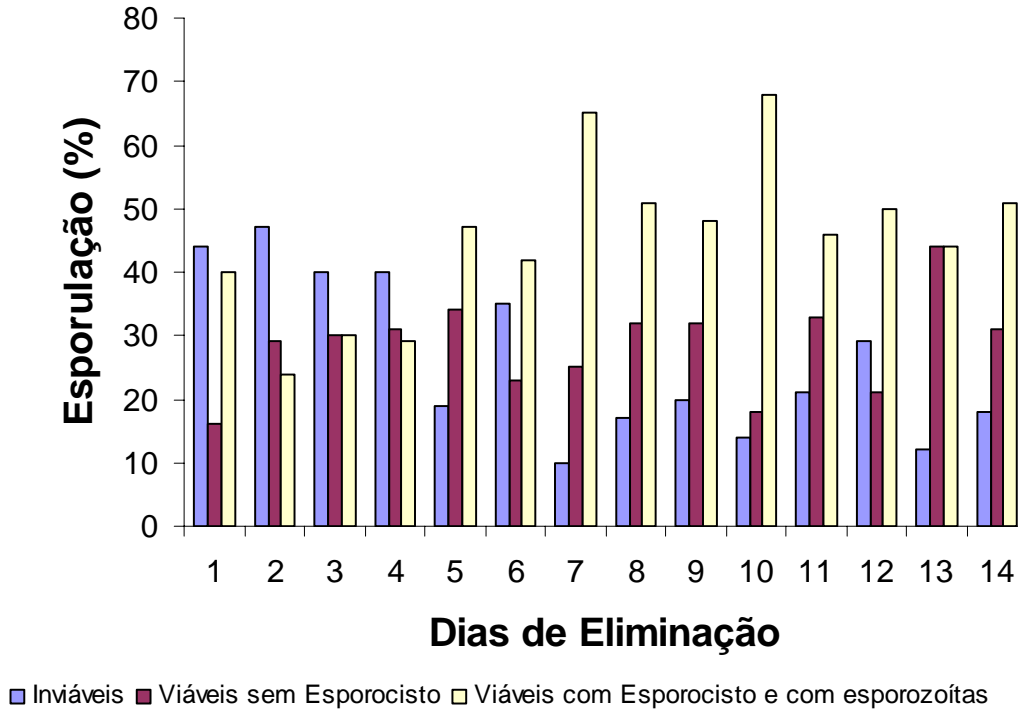


Figura 2. Determinação do percentual de esporulação por dia de eliminação das fezes de dois gatos experimentalmente infectados com oocistos esporulados de *Cystoisospora felis*.

Os oocistos esporulados de *C. felis* foram purificados, visando a remoção máxima de resíduos fecais, como primeiro passo foi utilizada a técnica rápida de limpeza e concentração de oocistos preconizada por Smith e Ruff (1975) onde utiliza bicarbonato de sódio a 1% e éter segundo para remoção da gordura das fezes deixando o material menos denso e grumoso. Antes do início das etapas subseqüentes de limpeza foi adicionado um ml de H₂SO₄ a 10% na proporção 1:10 no material fecal, para evitar a proliferação de fungos e bactérias, devendo logo após ser lavado, no mínimo cinco vezes com água destilada para remoção de resíduos químicos, como o ácido sulfúrico e o éter. Como segundo passo e para uma boa concentração dos oocistos esporulados de *C. felis*, o material recuperado foi submetido a técnica de suspensão por sacarose segundo Truong e Ferrari (2006), para ter uma melhor separação dos oocistos esporulados dos resíduos fecais, pois por diferença de densidade as partículas mais densas submergiram e as partículas mais leves flutuaram, a partir deste princípio os oocistos flutuaram se separando do resíduo fecal. Esse sobrenadante recuperado foi diluído em PBS pH 7,2 e em seguida centrifugado e o “pelet” armazenado.

O “pelet” que foi reservado na segunda etapa foi submetido a terceira etapa de limpeza, utilizando a técnica centrifugo-flutuação em camada dupla descontínua primária e secundária de solução de sacarose (ARROWOOD; STERLING, 1987) com modificações. Adaptou-se a técnica para tubos vítreos de hemólise com capacidade de 15 ml, onde utilizou-se: 5 ml de solução de sacarose com gravidade específica (g.e.) próxima a 1.103 g/l; 5 ml de solução saturada de açúcar com g.e. próxima a 1.064 g/l e 2,5 de suspensão aquosa de oocistos esporulados de *C. felis* provenientes do segundo passo de limpeza. As soluções de sacarose foram enriquecidas com tween 80 e centrifugadas, conforme referencia supracitada. Após a centrifugação, obteve-se, em meio a solução de sacarose, dois anéis horizontais de material levemente esbranquiçado (figura 3) que foram removidos através de sucção, utilizando-se pipeta automática de 1000 µl e ponteiros plásticos de poliestireno, o material removido da solução de sacarose estava rico em oocistos de *C. felis* e com expressiva diminuição de resíduos fecais. A suspensão purificada de oocistos foi diluída em água destilada na proporção 1:1 e centrifugada (f.c.) de 1.500 G por 10 minutos a 10° C. O sedimento foi ressuspensionado em solução salina de Hank com penicilina, estreptomicina e anfotericina B e armazenado a temperatura de refrigeração, em torno de 4° C para posterior utilização.

3.5 Preparação, sonicação e dosagem de proteínas de oocistos esporulados de *Cystoisospora felis*

Para certificar que a amostra refrigerada, de oocistos esporulados de *C. felis*, estava livre de contaminantes como fungos e/ou bactérias (figura 4), esta foi lavada com Ácido Sulfúrico a 10% e deixado interagir por 20 minutos. Aproximadamente um ml de solução na concentração de 5 x 10⁶ oocistos esporulados de *C. felis* foi tomada e a solução de preservação associada com Ácido Sulfúrico a 10% foi removida através de centrifugação, conforme o parágrafo anterior. O sedimento rico em oocistos foi ressuspensionado e centrifugado em tubos cônicos de poliestireno em 5 ml de PBS estéril, cinco vezes, para remoção de todo resíduo do Ácido Sulfúrico e da solução de conservação. Ao final deste processo o sedimento foi ressuspensionado mais uma vez em 0,5 ml de solução de PBS estéril e transferido para um tubo tipo “Eppendorf”, de capacidade de 2 ml, sendo adicionado em seguida o mesmo volume de inibidor de protease^g para evitar a ação de enzimas que degradem as proteínas, fornecendo uma solução final na proporção de 1:1.

^g Protease Inhibitor Cocktail for general use./ Sigma® – Aldrich, Inc., EUA



Figura 3. Dupla camada primária e secundária de solução de sacarose (ARROWOOD; STERLING, 1987) com adaptações.



Figura 4. Oocistos esporulados de *Cystoisospora felis*, após a utilização do processo de limpeza de resíduos fecais. Solução de sacarose (escala = 10 μ m).

Este material foi submetido ao Ultrassom^g com ponta filiforme a 60 Hz, em 100 ciclos de duração de 30 segundos com intervalos de 30 segundos de descanso em banho de gelo, para desfragmentação total dos oocistos esporulados de *C. felis*.

Para se estabelecer um volume de oocistos apropriado para uma expressão mais nítida das bandas proteicas, foi necessária a quantificação dos oocistos em câmara hemocitométrica, onde são contados o número de oocistos nos quatro quadrantes externos, os valores obtidos foram somados e multiplicados pela constante de 10.000. Conforme fórmula abaixo:

$$\frac{\text{Células somadas nos 4 quadrantes}}{4} \times 2 \times 10.000 = \text{oocistos/ml}$$

4

O ultrassonicado de oocistos esporulados de *C. felis* foi submetido à dosagem protéica segundo a técnica de Folin (LOWRY et al., 1951), obtendo-se uma concentração média de proteínas de 4,05mg/ml. Em seguida o material foi armazenado a -20 °C até o momento da aplicação em gel de poliacrilamida-SDS.

3.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) de sonicado de oocistos esporulados de *Cystoisospora felis*

Para desenvolvimento da eletroforese, ao material ultrassonicado de oocistos de *C. felis* foi adicionado 500 µl de tampão de solubilização (2% 2-mercaptoetanol, 12,5 mM tampão Tris-HCl pH 6,8, glicerol a 20%, 2 mM PMSF, SDS a 4,6%) e submetidos a aquecimento em banho termostático a 100 °C por cinco minutos com a finalidade de promover a desnaturação de suas proteínas constituintes.

A eletroforese em sistema descontínuo (LAEMMLI, 1970; ANDREWS, 1981; ALFENAS, 1998), foi realizada em gel de SDS-poliacrilamida a 10 e 12% (SDS-PAGE) com proporção acrilamida-bis acrilamida 30:1; utilizando cuba para eletroforese^h, fonte geradora de corrente elétricaⁱ e unidade de refrigeração^j.(Figura 5)

Realizou-se a injeção progressiva de ultrassonicado de oocistos de *C. felis* em poços isolados (Figura 6) do gel nas seguintes quantidades, de padrão e proteína bruta: 15, 60 e 60 µl, respectivamente. O processo de eletroforese foi executado a 150 Volts para fase de empilhamento e resolução do gel por aproximadamente uma hora e dez minutos.

Após a corrida, o gel foi fixado em solução de metanol-ácido acético por 15 minutos, à temperatura ambiente. Corado por solução de azul de Comassie 250R^l por 45 minutos a

^g Fischer, LKB, EUA

^h Mini protean II Bio Rad Laboratories, EUA.

ⁱ Power Pac 1000 BioRad, EUA.

^j 2219 Multitemp II Thermostatic Circulator (LKB) Broma, EUA.

^l Bio Rad, Laboratories, EUA



Figura 5. Sistema completo para realização da eletroforese descontínua em gel de poliacrilamida-SDS. Fonte geradora de corrente elétrica (A), Cuba para eletroforese (B) e Unidade de refrigeração (C).

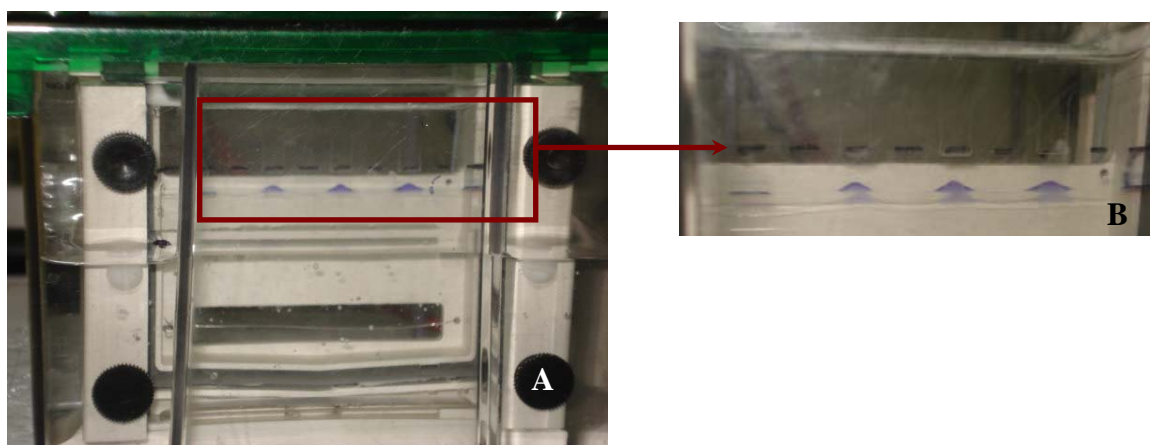


Figura 6. Eletroforese descontínua em gel de poliacrilamida a 10% (A), em detalhe os poços isolados para aplicação das amostras e as mesmas se deslocando em função do campo elétrico (B).

temperatura ambiente, em seguida descorado com solução ácido acético-metanol até a total revelação dos zimogramas. Com o gel corado, sua imagem foi capturada^m e depois analisado por um programaⁿ específico para determinar o peso molecular e todas as características dos zimogramas. Logo após esse processo, o gel foi re-fixado em solução de ácido acético a 5% por 30 minutos, à temperatura ambiente e montado em papel celofane poroso^o para registro do ensaio.

Utilizou-se um padrão protéico^p de alto peso molecular para a eletroforese contendo, dez bandas de ampla gama (10 – 250 KDa) e múltiplas cores.

3.7 Obtenção de soro heterólogo anti-*C. felis*

Os animais obtidos do CANP foram transferidos para as instalações do laboratório de Coccídios e coccidíoses (LCC) - Projeto de Sanidade Animal (Embrapa/UFRRJ), Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária, Seropédica, RJ. Colocadas em baia isolada e em gaiolas individuais, foram inoculadas com extrato de proteína total de oocistos de *C. felis*, foram utilizadas para produção de soro leporino hiperimune anti-*C. felis* através de inoculação intramuscular e subcutânea equivalente a 5×10^6 oocistos em adição a 800 µl de adjuvante completo e incompleto de Freund e 200 µl de PBS pH 7,2 segundo Stibbs e Ongerth (1986).

Para o acompanhamento do desenvolvimento da infecção experimental de proteínas de *C. felis* em coelhos foram feitas coletas de sangue dos animais infectados, a partir da veia da orelha, com intervalos de dez dias entre elas. Perfazendo um total de seis amostras sanguíneas com a evolução de 10, 21, 31, 42, 52 e 63 dias após a infecção (DAI), para utilização no teste de “western blotting”, ao fim do experimento o animal negativo foi doado e o animal infectado foi sacrificado. Os procedimentos de manutenção e eutanásia para os coelhos seguiram as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal - (COBEA, 2006) e pelo Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV, 2008).

3.8 Transferência das proteínas de *Cystoisospora felis* do gel para o papel “Western Blotting”

O procedimento de transferência das proteínas do gel para o papel foi adaptado segundo a técnica de Towbin et al. (1979) e Burnette (1981), para uma recuperação

quantitativa das proteínas contidas em géis de poliacrilamida-SDS a 12%. Foi montado um sanduíche com as seguintes camadas: uma almofada de poliestireno porosa (13.5 x 14 cm e 1.2 mm); três a quatro folhas de papel filtro^p 10,5 x 8,5 cm; o gel de poliacrilamida-SDS contendo as proteínas (10 x 8 cm), papel de nitrocelulose^q com 0,45 µm de espessura, mais

três a quatro folhas de papel filtro e finalizando uma segunda folha de espuma de poliestireno porosa. Todos os componentes do sanduíche foram pré-umedecidos na solução de transferência (Glicina 30%, Trisbase, SDS a 10% e Metanol). O sanduíche foi colocado na cuba de transferência^r, submerso no tampão de transferência e o processo de eletrotransferência executado a 30 Volts durante aproximadamente quatro horas. Após esse período, o sanduíche foi desmontado e a membrana de nitrocelulose corada com *Ponceau S*^s,

^m Molecular imager ® Gel Doc™ and ChemiDoc™ Systems – Bio Rad Laboratories Inc, EUA

ⁿ Quantity One® SigmaVersão 4.5.2/ 1-D Analysis Software – Bio Rad, Laboratories, EUA

^o Biomed, Pharmacia, Suécia

^p precision Plus Protein Standards/Kaleidoscope™ – Bio Rad Laboratories Inc, EUA

^r Munktell® - Papel Filtro, Suécia

^q Supported Nitrocellulose Membrane , Bio Rad, EUA

^r Mini trans-Blot® Cell – Bio Rad, EUA

^s Sigma®-Aldrich Chemie GmbH, Alemanha

para possibilitar a visualização e certificar que as proteínas foram eletrotransferidas, depois a membrana foi descorada com água destilada e cortada em fitas, agora designadas como 'blots'.

Os 'blots' foram incubados com leite em pó desnatado^t e submetidos ao agitador de Kline^u por uma hora. Esta substância bloqueante, tem como função ocupar os espaços livres entre as bandas na membrana impedindo as interações não específicas entre a membrana e o anticorpo usado para a detecção da proteína alvo. Em seguida, os 'blots' foram colocados em bandejas com canaletas individuais para incubação destas, em soro hiperimune anti-*C. felis* na diluição 1:500 em PBSt pH 7,2, por agitação durante uma noite. Neste período o anticorpo reagiu com o antígeno adsorvido na membrana. Os 'blots' foram lavados com PBSt pH 7,2 e depois adicionou-se o conjugado (IgG anti-IgG coelho^v, marcado com fosfatase alcalina) diluído 1:1000 em tampão fosfato com tween 20 (PBST) pH7,2. Este ultimo teve um período de incubação por duas horas.

O processo de imunodeteção ocorreu quando foi adicionado o substrato 5-Bromo-4-Chloro-3-Indol YL Phosphate/Nitro Blue Tetrazolium (BCIP/NBT)^x, contendo cromógeno, sobre as canaletas onde se encontravam os 'blots', ocorrendo a revelação gradativa das bandas, como pode ser observado na figura 7.

^t Molico®, Nestlé Brasil Ltda, SP

^u Certomat® MOII/B.Braun Biotech International, EUA

^v Sigma-Aldrich, Inc. EUA

^x Sigma-Chemical Co. EUA

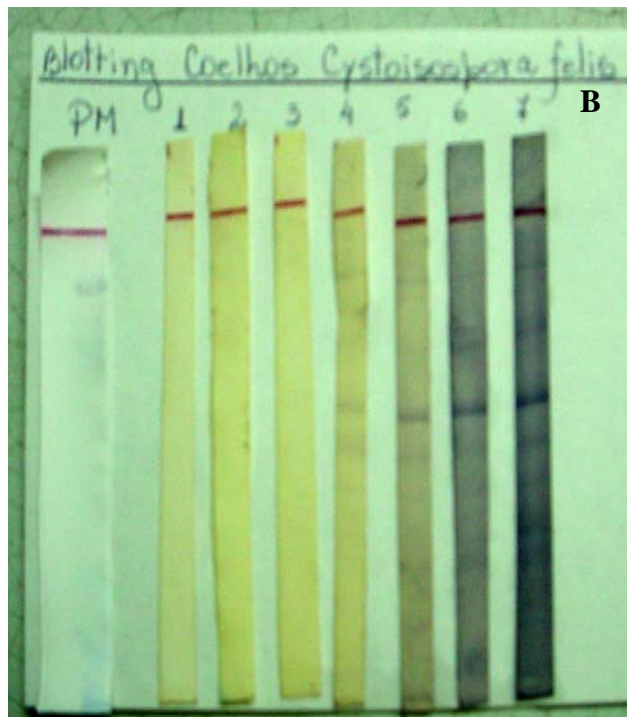


Figura 7. Resultado do teste de 'Western Blotting' em soro de coelho experimentalmente infectado em canaletas isoladas (A), montagem dos blots em Cartolina branca para análise das bandas (B).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Processo de isolamento e purificação de oocistos esporulados de *Cystoisospora felis*

O número de oocistos esporulados recuperados foi na ordem de 10^6 oocistos/ml, semelhante ao obtido previamente por Carvalho filho et al., (2004). Contudo, o que permitiu evidenciar um número maior de bandas no SDS-PAGE a 10% foi um melhor aproveitamento com relação aos oocistos e o uso de sua estrutura total. Com base, na análise dos dias de eliminação, foram escolhidos os dias com a maior porcentagem de esporulação (Figura 2) permitindo assim, a recuperação de oocistos com um maior número de estruturas integras, proporcionando um maior número de bandas de produto esporulado, de grande parte das proteínas constituintes de toda a estrutura dos oocistos. Associado ao trabalho com material recém eliminado, a agilidade do processo de esporulação, concentração e limpeza, não excedendo a um período superior a três meses o que evitou a ação das enzimas responsáveis pela degradação das proteínas existentes no oocisto esporulado, conforme o observado por Leek e Fayer (1979).

4.2 Análise morfológica de oocistos de *Cystoisospora felis*

Baseado em um número mínimo de 10 oocistos por dia de eliminação foram mensurados um total de 140 oocistos, dos quais foram obtidos as medidas dos diâmetros maior $41,27 \pm 2,45$ μm , menor $29,63 \pm 1,65$ μm e o Índice morfométrico $1,38 \pm 0,074$ μm , comparando-os com outros autores conforme observados na tabela abaixo.

Com base nos valores das medidas dos oocistos de *C. felis* foi feita a reta de regressão e foi possível evidenciar que no material coletado havia uma única espécie, pois a maioria dos valores se encontram próximos a reta e o valor de r^2 encontrado, apesar de ser abaixo de 0,5 se torna ideal para a análise desta espécie devido a seu pleomorfismo e seu formato elipsóide (figura 8).

Tabela 1. Comparação das medidas de oocistos esporulados de *Cystoisospora felis* registrados por diferentes autores.

Medidas (μm)	Autores			
	Rocha e Lopes (1971)	Shah (1971)	Carvalho filho et al. (2005)	Presente trabalho
Oocistos esporulados	100*	40*	40*	140*
Diâmetro maior	$39,38 \pm 3,07$	42 (38 – 51)**	$39,78 \pm 3,66$	$41,27 \pm 2,45$
Diâmetro menor	$30,51 \pm 2,18$	31 (27 – 39)**	$30,69 \pm 1,84$	$29,63 \pm 1,65$
Índice morfométrico	NA	NA	$1,30 \pm 0,10$	$1,38 \pm 0,074$

* Número de mensurações

** Média e intervalo de mensurações entre parênteses

NA – Não avaliado

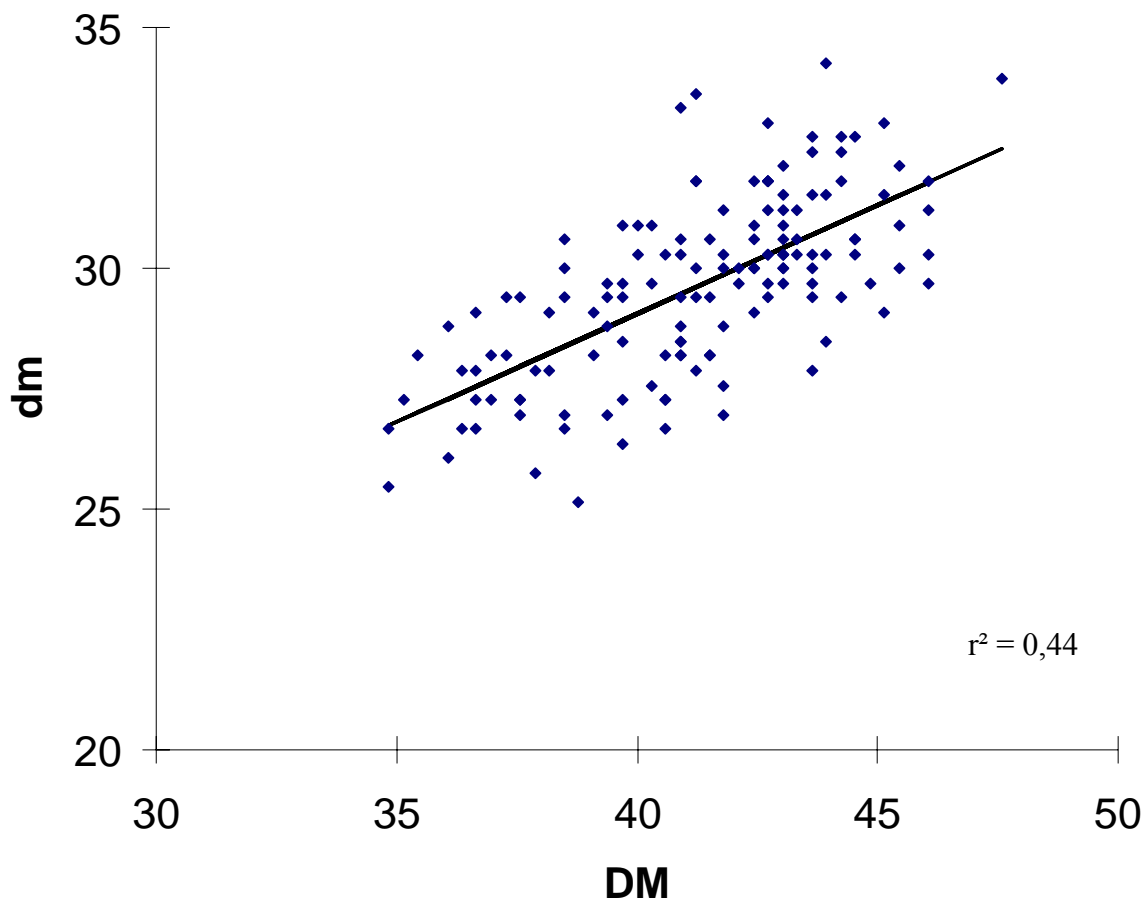


Figura 8. Retas de regressão dos valores de diâmetro maior e diâmetro menor dos oocistos esporulados de *C. felis*

Analisando a figura 9, que se refere as medidas dos oocistos esporulados de *C. felis*, observa-se que as frequências nas classes aumentam e diminuem gradativamente, ou seja, as medidas dos oocistos apresentam-se em menor quantidade nos limites dos valores e em maior quantidade nos valores medianos, caracterizando, assim, que o material recuperado possuía oocistos distribuídos de maneira uniforme assemelhando-se aos oocistos esporulados encontrados por Rocha e Lopes (1971) e Carvalho filho (2005).

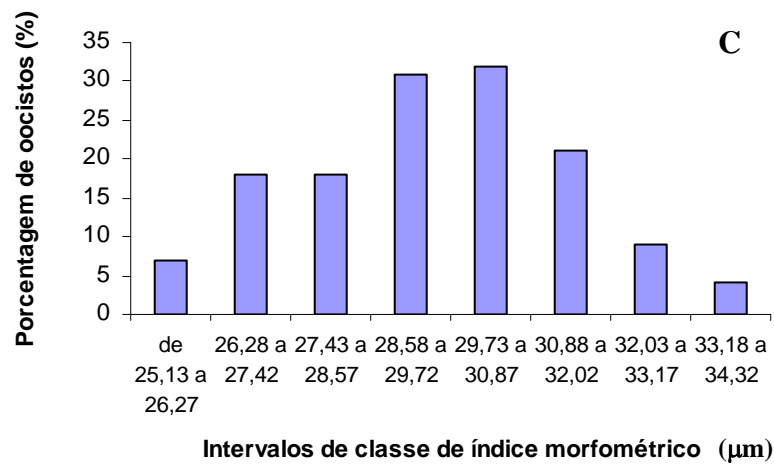
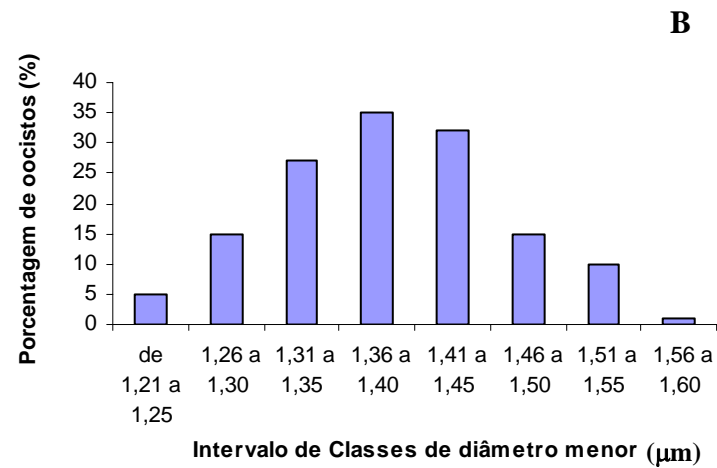
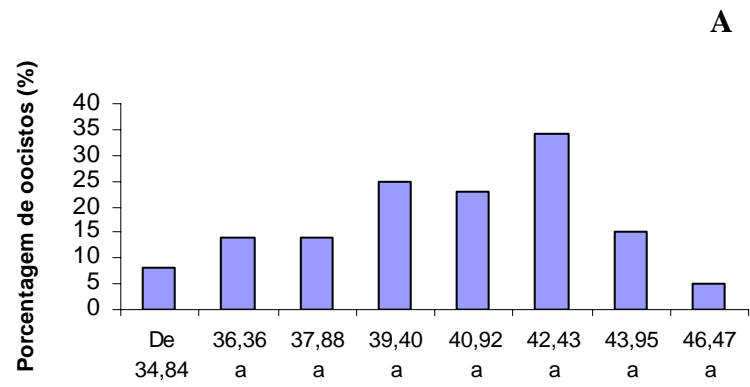


Figura 9. Distribuição das médias das frequências dos oocistos esporulados de *Cystoisospora felis* recuperados de fezes de gatos experimentalmente infectados. (a) Diâmetro maior, (b) Diâmetro menor e (c) Índice morfométrico.

4.3 Complexos protéicos obtidos de oocistos de *C. felis* esporulados através de SDS-PAGE a 10%

No gel a 10% foram identificadas 15 bandas protéicas, nos zimogramas de extratos de oocistos esporulados de *C. felis*. As bandas identificadas e calculadas a partir do programa Quantity One® tiveram os seguintes pesos moleculares: 36,53; 38,31; 44,88; 47,62; 51,14; 59,48; 75,26; 89,35; 95,22; 110,05; 129,63; 154,23; 194,00; 224,49 e 237,33 KDa (Figura 10), esses complexos protéicos são constituintes das estruturas dos oocistos, esporocistos e esporozoítas, e podem ser responsáveis por diferentes tipos de estímulos ao organismo hospedeiro para uma resposta imune específica ao parasita do presente estudo. Dentre as bandas encontradas, as de peso molecular 110,05; 75,26 e 47,62 KDa foram as bandas mais densas dentro dos zimogramas apresentando pico de densidade de 40,47, 39,11 e 47,53% , respectivamente (Figura 11).

As bandas encontradas no presente estudo são diferentes, em parte, das bandas apresentadas por Carvalho filho et al. (2004), as quais, apresentavam valores próximos e em menor número. Pode-se então atribuir a tais diferenças principalmente a fatores metodológicos e ao fato do material ter sido submetido ao processo de excistamento enzimático, com isso algumas estruturas dos oocistos esporulados de *C. felis*, podem ter se degradado com maior rapidez.

No presente estudo o percentual de esporulação dos oocistos por dia de eliminação, possibilitou uma seleção melhor de oocistos com o máximo de estruturas desenvolvidas, o que compensaria o fator de um volume menor de oocistos, na casa de 10^6 . Outro fator que deve ser levado em consideração é o tempo de armazenamento, pois quanto maior, mais tempo para ação das proteases sobre material biológico interferindo em sua viabilidade, mesmo em condições ótimas de armazenamento (LEEK; FAYER, 1979). No presente trabalho o período de esporulação, recuperação e limpeza, não excederam três meses, o que evitou a ação das proteases, bactérias e fungos, responsáveis por danos as estruturas dos oocistos e contaminação do material existente.

O processo de purificação dos oocistos foi reformulado e adaptado para *C. felis*, visando a máxima remoção de resíduos fecais para o seu uso na recuperação de extrato proteico.

Outro fator que poderia ter influenciado na integridade das proteínas, fornecendo proteínas de maior peso molecular, foi o processo de ultrassonicação onde os oocistos de *C. felis* foram diluídos na proporção de 1:1 (solução de oocistos e Coquetel inibidor de proteases) e depois submetidos a lise de sua estrutura, diferindo do procedimento realizado por Carvalho filho (2005), onde a lise era realizada e o inibidor de protease era adicionado após esse processo, associado também a uma análise manual feita com base, na correlação da distância percorrida pela proteína padrão com a distância percorrida da proteína da amostra. Neste caso cada corrida eletroforética possuir um erro maior quando calculada manualmente em comparação as leituras eletrônicas que são mais precisas.

Todos esses fatores levaram a algumas diferenças na recuperação de um número maior de bandas protéicas e de maior peso molecular, contudo os valores estão aproximados aos descritos por Carvalho filho et al. (2004). Incluindo pela análise visual comparada entre as corridas eletroforéticas do referido autor e o presente trabalho foi possível observar que o comportamento de distribuição das bandas foi o mesmo, sendo possível correlacionar um padrão de apresentação similar.

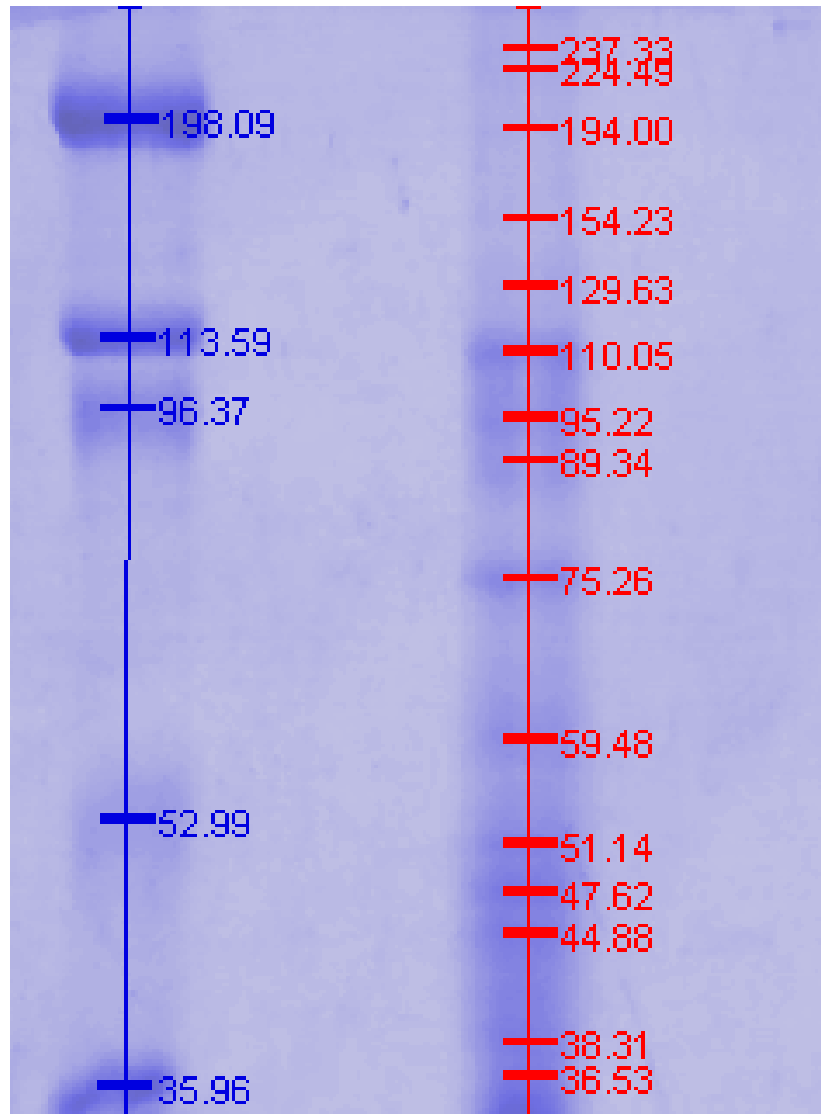


Figura 10. SDS-PAGE a 10% de proteínas de oocistos esporulados de *Cystoisospora felis*. A esquerda, padrões de peso molecular e a direita, proteínas de oocistos esporulados de *C. felis* em quilodaltons (kDa), coradas pelo azul de Coomassie 250R.

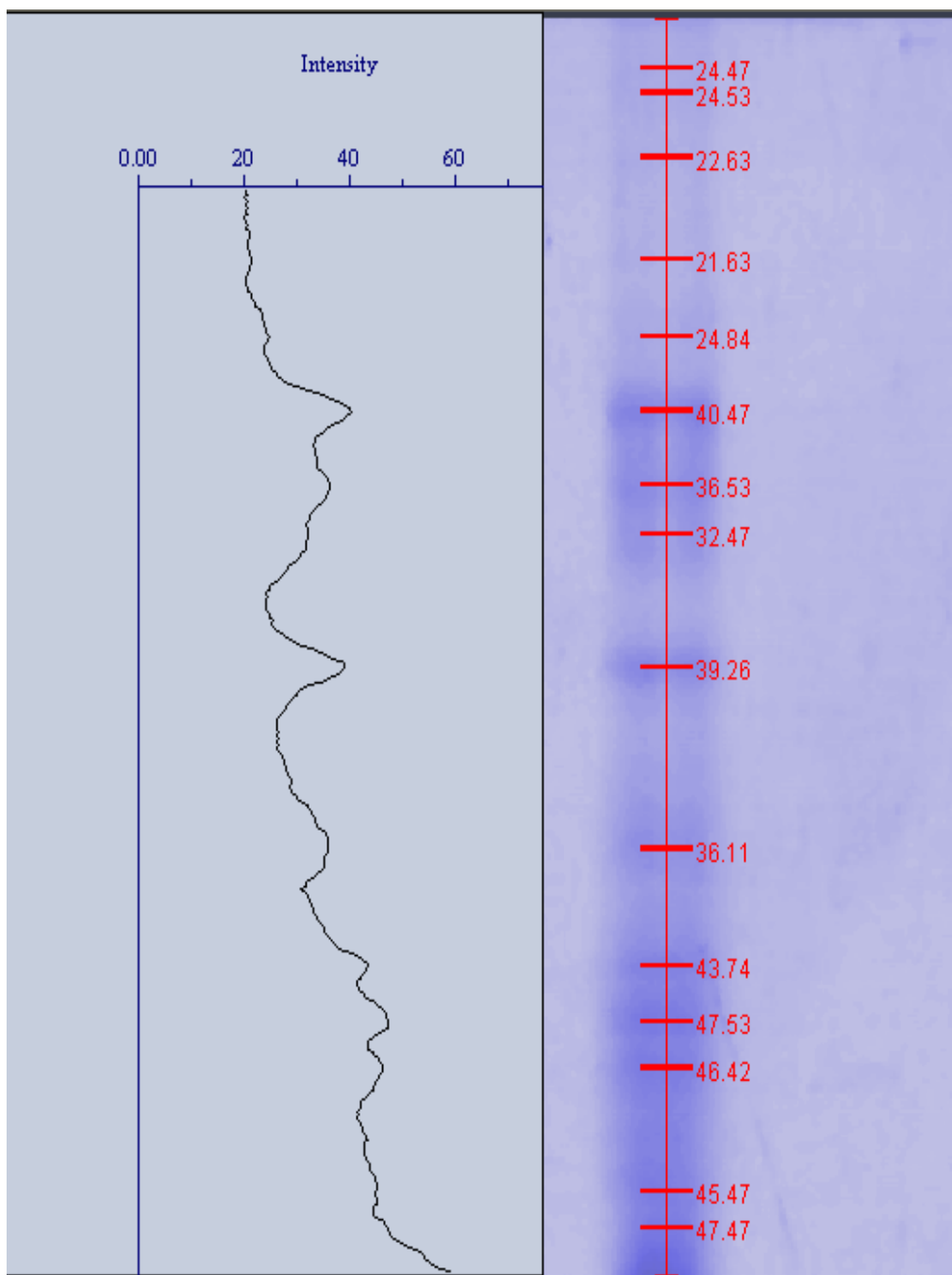


Figura 11. Gráfico do pico de densidade das bandas reveladas nos zimogramas, do SDS-PAGE a 10%.

4.4 Complexos protéicos de oocistos esporulados de *C. felis* obtidos através de SDS-PAGE a 12%

Na análise do gel a 12% foram evidenciadas, 22 bandas protéicas, nos zimogramas de extratos de oocistos esporulados de *C. felis*. As bandas identificadas e calculadas a partir do programa Quantity One® tiveram os seguintes pesos moleculares: 26,65; 29,71; 31,79; 36,41; 44,03; 50,09; 56,08; 62,64; 73,11; 77,55; 85,34; 97,62; 98,66; 101,40; 104,21; 109,23; 110,56; 113,21; 137,44; 180,50; 206,81 e 244,51 KDa (Figura 12). Com base nesses resultados, foi possível observar que no gel a 12% por possuir uma malha mais fina, houve uma retenção maior no número de proteínas de baixo peso molecular e um desdobramento melhor das proteínas de baixo e alto peso molecular, o que não ocorre no gel a 10% com uma malha mais porosa, permite uma apresentação mais condensada das proteínas. A escolha de um gel de concentração a 12% se mostrou mais adequada neste trabalho, permitindo, com isso, uma melhor análise eletroforética das proteínas constituintes dos oocistos esporulados de *C. felis*. Contudo, ainda é possível visualizar um condensado de proteínas no inferior dos zimogramas a 12%, significando que algumas destas proteínas ainda poderiam ser desdobradas.

O comportamento de distribuição das bandas ao longo dos zimogramas visualmente foi o mesmo em relação ao SDS-Page de 10% e 12%, sendo possível correlacionar as bandas pela proximidade de seus valores.

As bandas de 73,11; 104,21 e 113,21 KDa foram os complexos protéicos mais fortemente identificados nos zimogramas de ambas as corridas, apresentando um pico de densidade de 30,27; 14,00 e 13,21% respectivamente, esses valores foram obtidas através da análise no programa Quantity One® (Figura 13). Este grupo protéico, pode ser relacionado com a formação da estrutura da parede dos oocistos e esporocistos de *C. felis*. As Proteínas comuns da superfície dos oocistos de *Cryptosporidium parvum* Tyzzer, 1912 e *C. serpentis* Levine, 1980 foram similares quanto ao peso molecular com as bandas de 73, KDa de oocistos esporulados de *C. felis* e as bandas de alto peso molecular estão mais associadas a polipeptídeos de Superfície (TILLEY et al., 1990).

Sabe-se que oocistos e esporozoítas de *T. gondii* têm duas bandas protéicas com aproximadamente 25 e 67 KDa de peso molecular, as quais são ausentes em taquizoítas (KASPER; WARE, 1985). A proteína de 26,65 KDa do presente trabalho de produto esporulado de *C. felis* podem dividir similaridades com as de oocistos e esporozoítas de *T. gondii*, baseando-se nas relações taxionômicas relativamente homofiléticas entre as espécies de *Cystoisospora* e *T. gondii* (SMITH, 1981; CARRENO et al., 1998; SAMARASINGHE, et al., 2008).

Diversos estudos relacionados à identificação de antígenos e proteínas constituintes de diferentes fases do ciclo biológico de *T. gondii* têm sido estudados. Proteínas de 14; 22; 30; 43 e 97 KDa são freqüentemente encontrados em taquizoítas da cepa C e RH de *T. gondii*. Entretanto, determinados complexos protéicos de esporozoítas de *T. gondii* têm sido identificados como específicos para esporozoítas de *T. gondii* (KASPER et al., 1984; KASPER; WARE, 1985). Tais proteínas têm sido observadas com pesos moleculares de 25 e 67 KDa. Flausino et al. (1997), ao avaliar proteínas constituintes de taquizoítas da cepa C congênita e da “SERO-47” de *T. gondii* isolada de cérebro e coração de galinhas, observaram grupos comuns de 30; 34,7; 43; 50; 58; 67; 80; 97 KDa. A semelhança destes trabalhos o grupo protéico de 97 KDa foi evidenciada no presente trabalho no extrato total oocistos esporulados de *C. felis*

Mesmo com o grande conhecimento acerca de constituintes protéicos e antigênicos de outras espécies da família Sarcocystieda, em especial *T. gondii*, muito pouco se sabe ainda sobre

¹¹ Quantity One® SigmaVersão 4.5.2/ 1-D Analysis Software – Bio Rad, Laboratories, USA

o mesmo em espécies do gênero *Cystoisospora* e sua inter-relação com demais coccídios desta família.

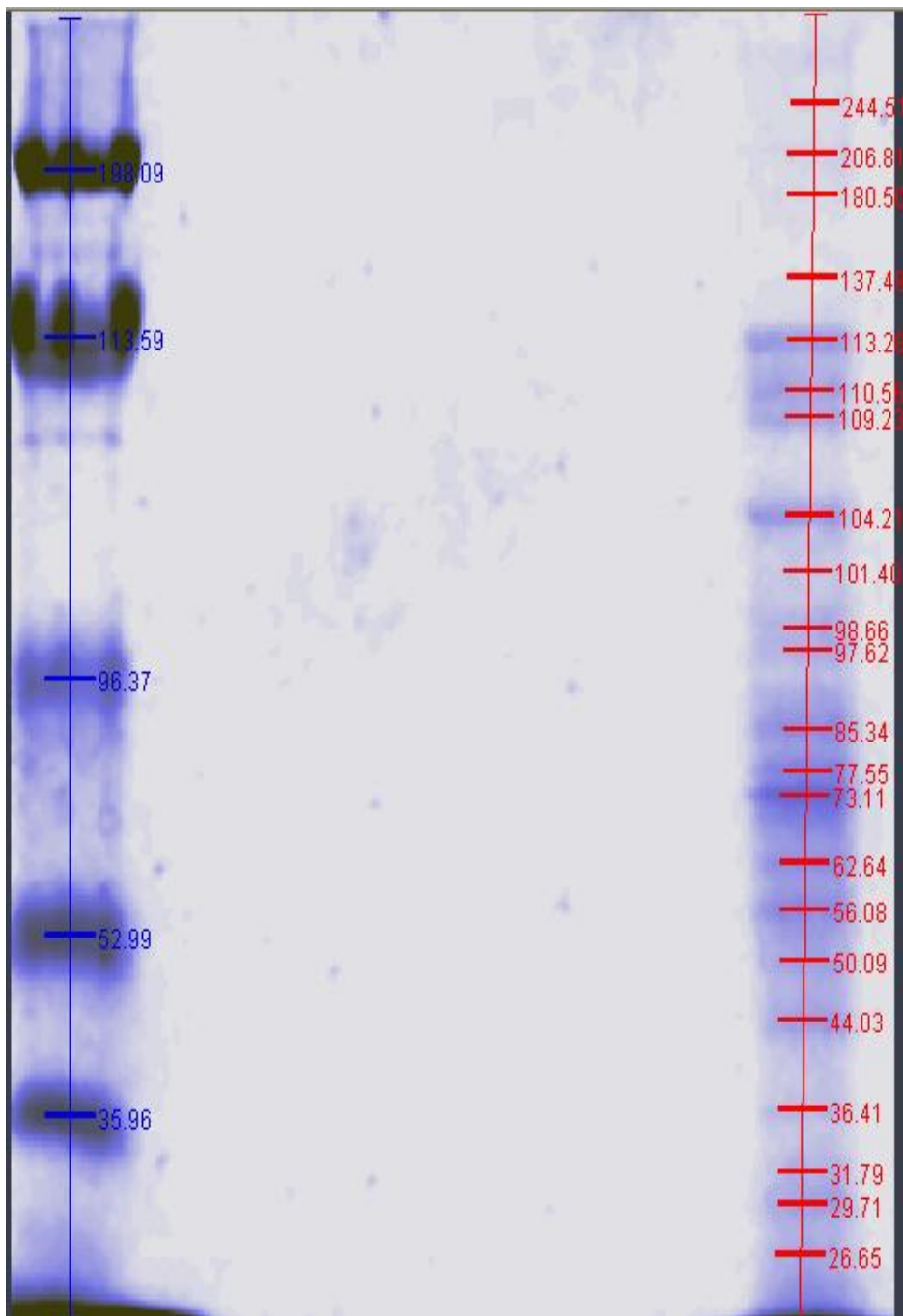


Figura 12. SDS-PAGE a 12% de proteínas de oocistos esporulados de *Cystoisospora felis*. À esquerda, padrões de peso molecular e à direita, proteínas de oocistos esporulados de *C. felis* em quilodaltons (kDa), coradas pelo azul de Coomassie 250R.

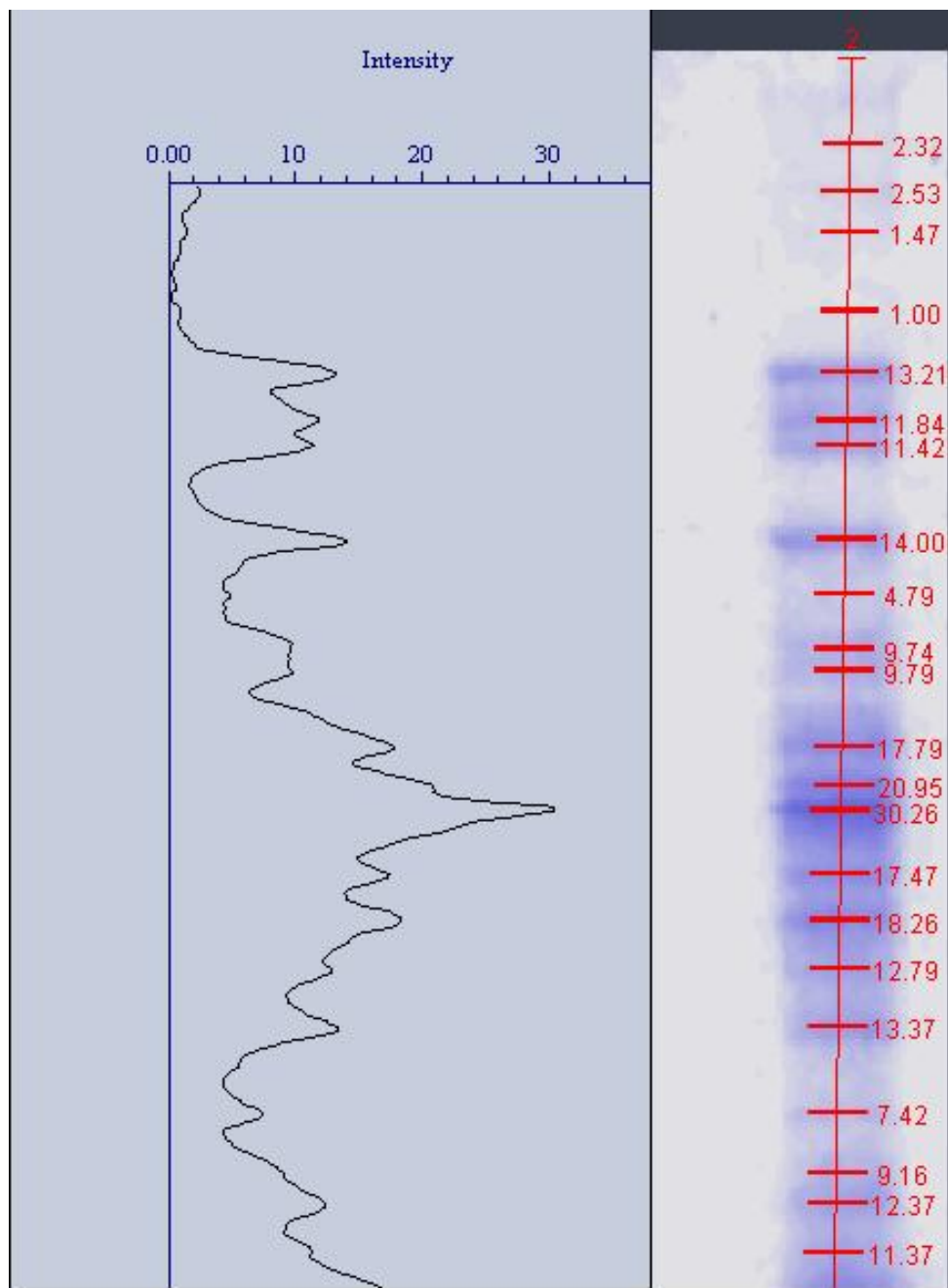


Figura 13. Gráfico do pico de densidade das bandas reveladas nos zimogramas, do SDS-PAGE a 12% de oocistos esporulados de *C. felis*.

4.5 Resultados do teste de imunodeteccção em situação experimental

No "Western blotting", quando as amostras de soro heterólogo anti-*C. felis* foram testadas apresentaram um perfil antigênico da amostra de *C. felis* gradual de acordo com a progressão da infecção. Foram testadas amostras sanguíneas com: dia zero, 10, 20, 30, 40, 50 e 63 dias após infecção (DAI) dos coelhos com extrato total de oocistos esporulados de *C. felis*. Pde-se então observar a seguinte apresentao antignica: negativo, negativo, negativo, quatro, cinco, oito e 13 bandas (Figura 14), respectivamente. Das amostras sanguíneas coletadas de coelhos hiperimunes, a que se refere ao 63^o DAI, foi a que apresentou maior número de bandas e com maior intensidade, o que nos permite acompanhar a progressão da infecção, de sua fase aguda até sua fase crnica. Dentre os antígenos observados, podem-se destacar 13 bandas de peso molecular aproximado de 39,39; 42,18; 44,40; 47,82; 55,46; 57-59; 64-68; 77,41; 92-93; 99,58; 103-104; 112-113 e 200-203 referidas no presente trabalho como: p39,39; p42,18; p44,40; p47,82; p55,46; p58,75; p66,08; p77,41; p92,85; p99,58; p104,10; p112,84 e p203,15. Dentre os antígenos obtidos; p39,39; p42,18; p44,40; p47,82 e p55,46 se evidenciam apenas ao 63^o dia de infecção, período considerado crnico.

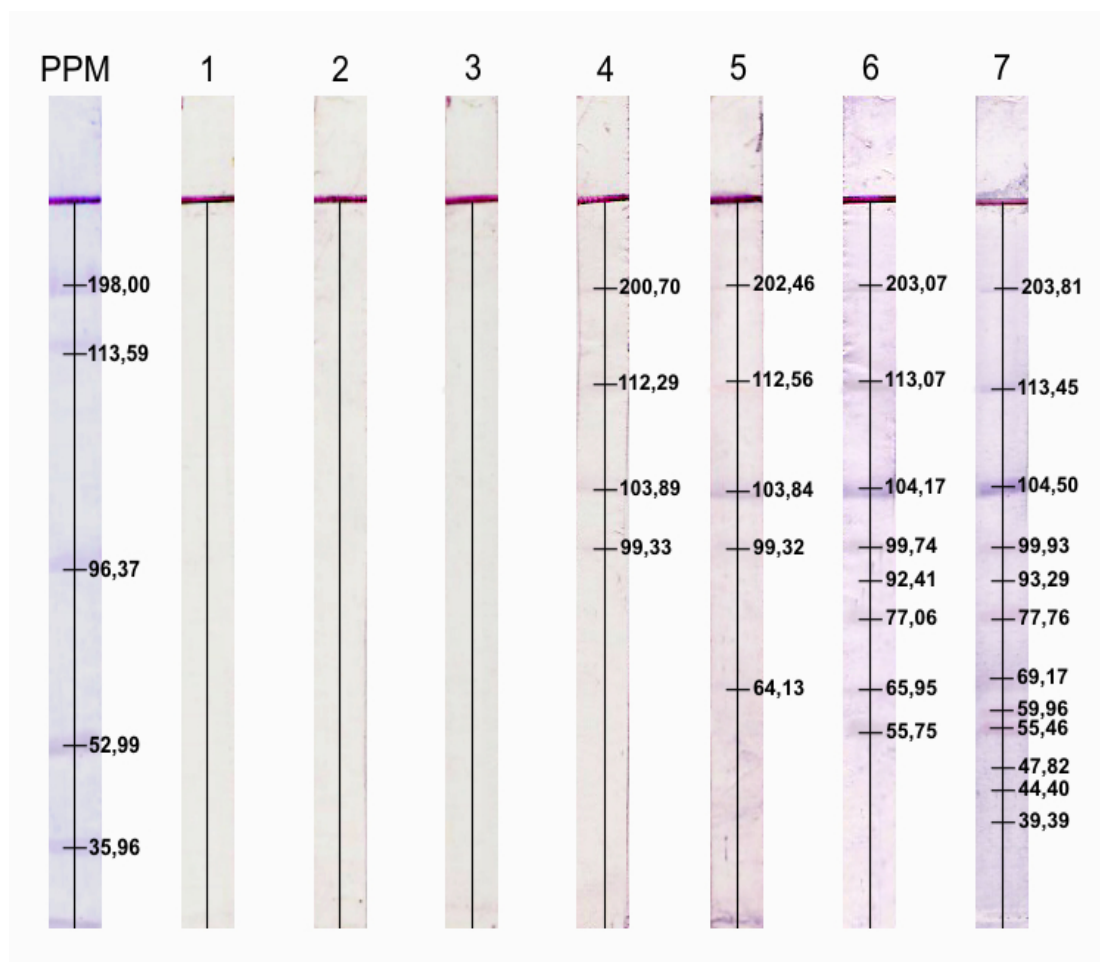


Figura 14. Resultado do Western blotting com soro heterólogo anti-*C. felis*, de coelho infectado com 10⁶ oocistos esporulados, referentes aos zero, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 DAI.

4.6 Resultados do teste de imunodeteccão em condiçã de infecçã natural

No “Western Blotting”, aplicado ao soro homólogo de coelhos oriundos de propriedades rústicas, foi possível identificar alguns animais que responderam positivamente aos antígenos de *C. felis*, provavelmente oriundos de esporozoítas.

Dos nove animais testados pelo método de imunodeteccão padronizada para *C. felis*, seis apresentaram positividade ao teste. Do total de antígenos observados 9 grupos antigênicos identificados nos animais poderiam confirmar que estes tiveram contato com o parasito do presente estudo, tais grupos foram: p38; p92; p97; p 100; p109; p110; p105; p111 e p 202 (Figura 15). Estes antígenos se assemelham aos valores encontrados no imunoblotting realizado frente ao soro heterólogo em coelho anti-*C. felis*, infectados experimentalmente.

Os antígenos de peso molecular 158 e 198 KDa não foram reconhecidos dentro do grupo de antígenos padronizados como específicos de *C. felis*. Podendo corresponder a problemas com as amostras levemente hemolisadas outra hipótese está relacionada ao fato dos animais pertencerem a criações rústicas, de manejo precário e alta promiscuidade com outros animais podemos inferir que a possibilidade de contato com outros tipos de parasitos que por ventura podem dividir similaridade entre as proteínas constituintes da parede de oocistos e esporozoítos de *C. felis* é grande. Outra hipótese que poderia ser levantada, em relação a estes grupos antigênicos, poderiam se tratar de uma “cepa” diferente do mesmo parasito, que pelo fato de estar se mantendo de maneira livre no ambiente, sem a intervençã de fatores limitantes e em a associaçã com outros tipos de coccídios, possa apresentar outros grupos antigênicos.

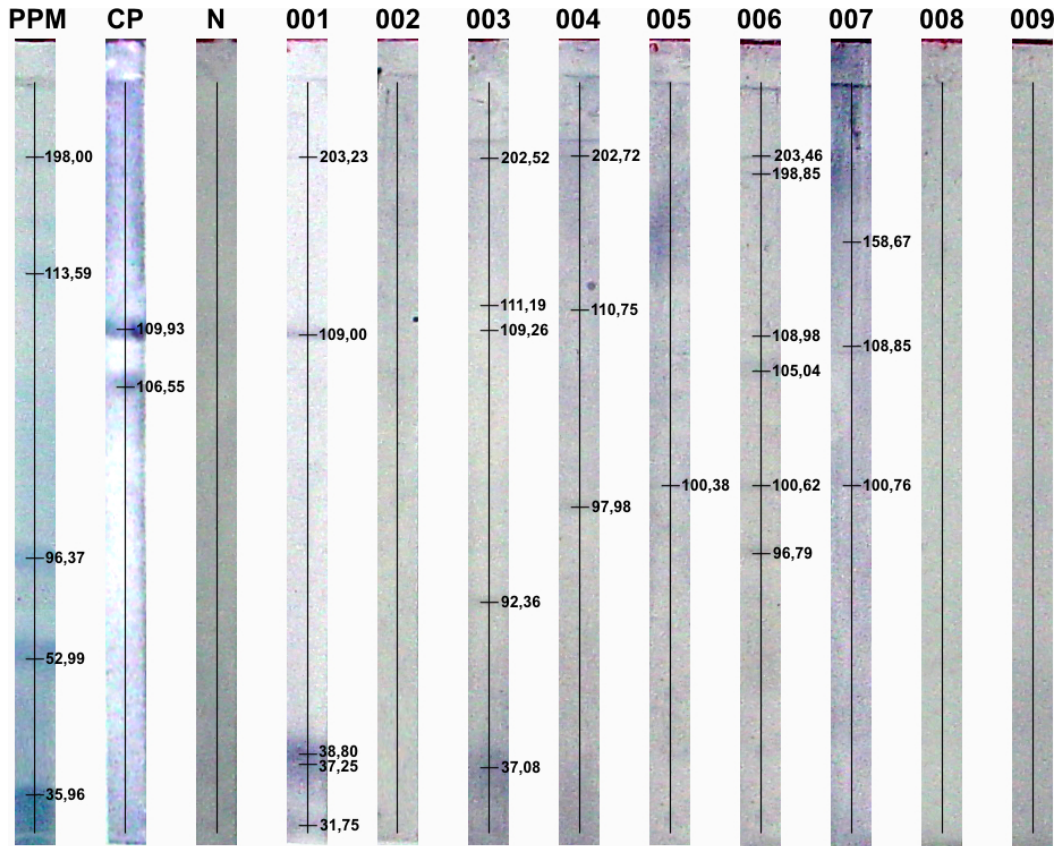


Figura 15. Resultado do teste de ‘Western blotting’ em soro de coelhos, provenientes de propriedades da região serrana do estado Rio de Janeiro, infectados naturalmente. (PPM - Padrão de Peso Molecular, CP - Controle positivo, N - Negativo e 001 a 009 - Soro de coelhos oriundo de criações rústicas.)

5 CONCLUSÃO

1. A associação das técnicas de limpeza adaptadas para oocistos esporulados de *C. felis*, forneceram um material mais integro, e livre de microbiota fecal, contribuindo para o uso deste material na caracterização fenotípica e no diagnóstico pelo “Western Blotting”.
2. A eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% foi mais adequada para identificação dos principais constituintes protéicos de oocistos esporulados de *C. felis*, revelando grupos protéicos principais enquanto o gel a 10 % evidenciou um número maior de bandas, que somam mais informações a caracterização fenotípica desta espécie de coccídio.
3. Foram evidenciados no “western blotting” os grupos antigênicos específicos de *C. felis*, permitindo o diagnóstico da infecção através da reação contra antígenos específicos deste parasito.
4. A utilização do “western blotting” anti-*C. felis* é eficaz, para detecção de antígenos de *C. felis* em animais naturalmente infectados, determinando com isso a capacidade de coelhos serem portadores de infecção natural. Sendo encontrados grupos antigênicos, similares aos evidenciados no grupo de coelhos infectados experimentalmente com 10^6 oocistos de *C. felis*. Podendo estar relacionadas a infecção pelos esporozoítas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A.C. *Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins. Fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos*. 1ª ed., Viçosa: EUFV, 1998. 574p.
- AMARAL, V.; AMARO, R.G.; BIRGEL, E.H. Ocorrência da *Isospora felis* Wenyon, 1923, em suçuarana (*Puma concolor*). *Revista da Sociedade Paulista de Medicina Veterinária*, v. 4, n. 1, p. 25-28, 1966.
- ANDRADE, C.M. *Meios e soluções comumente empregados em laboratórios*. 1ª ed., Seropédica: EDUR, 2000. 353p.
- ANDREWS, A.T. *Eletrophoresis: theory, techniques, and biochemical and clinical applications*. Monographs on Physical Biochemistry. Oxford: Clarendon Press. 1981. 336p.
- ARAÚJO, F.G.; DUBEY, J.P.; REMINGTON, J.S. Antigenic similarity between the coccidian parasites *Toxoplasma gondii* and *Hammondia hammondi*. *Journal of Protozoology*, v. 31, n. 1, p. 145-147, 1984.
- ARROWOOD, M.J.; STERLING, C.R. Isolation of *Cryptosporidium* oocysts and sporozoites using discontinuous sucrose and isopycnic percoll gradients. *Journal of Parasitology*, v. 73, n. 2, p. 314-319, 1987.
- BARBER, J.S.; TREES, A.J. Naturally occurring vertical transmission of *Neospora caninum* in dogs. *International Journal for Parasitology*, v. 28, n. 1, p. 57-64, 1998.
- BARRETTO, J.F.; ALMEIDA, J.L. de. Primeiras observações sobre a presença de *Isospora felis* Wenyon, 1923 (Protozoa-Eimeridia) em felídeos no Brasil. *Boletim da Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 8, n. 2, p. 357-360, 1937.
- BERTO, P.B.; LOPES, B. DO B.; FLAUSINO, W.; TEIXEIRA-FILHO, W.L, LOPES, C.W.G. Contribution on the study of *Isospora hemidactyli* Carini, 1936 and a report of an adeleid pseudoparasite of the house gecko *Hemidactylus mabouia*, from Rio de Janeiro metropolitan region, Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 17, n. 3, p. 150 - 154, 2008.
- BOX, E.D. Life cycles of two *Isospora* species in the canary, *Serinus canarius* Linnaeus. *Journal of Protozoology*, v. 21, n. 1, p. 57-67, 1977.
- BOX, E.D. *Isospora* as an extraintestinal parasite of passerine birds. *Journal of Protozoology*, v. 28, n. 2, p. 244-246, 1981.
- BOX, E.D.; MARCHIONDO, A.A.; DUSZYNSKI, D.W.; DAVIS, C.P. Ultrastructure of *Sarcocystis* sporocysts from passerine birds and opossums: comments on classification of the genus *Isospora*. *Journal of Parasitology*, v. 66, n. 1, p. 68-74, 1980.

- BURNETTE, W.N. “Western Blotting”: Eletrophoretic transfer of Proteins from Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gels to Unmodified Nitrocellulose and Radiographic Detection with Antibody and Radioiodinated Protein A. *Analytical Biochemistry*, n.112, p. 195 – 203, 1981.
- BRÖSIGKE, S.; HEINE, J.; BOCH, J. DER NACHWELS Extraintestinalen entwicklungstadien (dormozoitien) in experimentall mit *Cystoisospora rivolta* oozysten infierten mause. *Klientier Praxis*, v. 27, n. 1, P. 25- 34, 1982.
- CARRENO, R.A.; SCHNITZLER, B.E.; JEFFRIES, A.C.; TENTER, A.M.; JOHNSON, A.M.; BARTA, J.R. Phylogenetic analysis of coccidia based on 18S rDNA sequence comparison indicates that *Isospora* is most closely related to *Toxoplasma* and *Neospora*. *Journal of Eukariotic Microbiology*, v. 45, n. 2, p. 184-188, 1998.
- CARVALHO FILHO, P. R. de. *Caracterização fenotípica dos estágios exógenos de Cystoisospora felis (Wenyon, 1923) Frenkel, 1977 (Apicomplexa: Cystoisosporinae)*. Seropédica; UFRRJ, 2005. 71p. Dissertação (Ciências Veterinárias) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2005.
- CARVALHO FILHO, P.R.; MELO, P.S.; MASSAD, F.V.; LOPES, C.W.G. Determinação da infecção de suínos por *Cystoisospora felis* (Wenyon, 1923) Frenkel, 1977 (Apicomplexa: Cystoisosporinae) através de prova biológica em felinos livres de coccídios. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 12, n. 1, p. 7-12, 2003.
- CARVALHO FILHO, P.R.; FLAUSINO, W.; LOPES, C.W.G. Electrophoretic protein pattern of *Cystoisospora felis* (WENYON, 1923) FRENKEL, 1977 (Apicomplexa: Cystoisosporinae) sporulated oocysts. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 13, n. 4, p. 173-175, 2004.
- CHARIF, H.; DARCY, F.; TORPIER, G.; CESBRON-DELAUW, M.F.; CAPRON, A. *Toxoplasma gondii*: characterization and localization of antigens secreted from tachyzoites. *Experimetal Parasitology*, v. 71, n. 1, p. 114-124, 1990.
- CHESSUM, B.S. Reactivation of *Toxoplasma* oocyst production in the cat by infection with *Isospora felis*. *British Veterinary Journal*, v. 128, n. 7, p. 33-36, 1972.
- COLEGIO BRASILEIRO de EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL . Legislação & Ética. Disponível em: < www.cobea.org.br/etica.htm >. Capturado em: 25 Jul. 2006.
- CORLISS, J.O. An interim utilitarian (“User-friendly”) hierarchical classification and characterization of the protists. *Acta Protozoologica*, v. 33, n. 1, p. 1-51, 1994.
- COSTA, P.S. da; LOPES, C.W.G. Avaliação do parasitismo por *Cystoisospora felis* (Wenyon, 1923) Frenkel, 1977 (Apicomplexa: Cystoisosporinae) em coelhos do tipo carne. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 7, n. 1, p. 15-19, 1998.

CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA. Legislação. Disponível em: <www.cfmv.org.br> Capturado em: 30 ago. 2006.

DUBEY, J.P. Experimental *Isoospora canis* and *I. felis* infection in mice, cats and dogs. *Journal of Protozoology*, v. 22, n. 3, p. 416-417. 1975.

DUBEY, J.P. Intestinal protozoa infections. *Veterinary Clinic of North America Small Animal Practice*, v. 23, n. 1, p. 37-55, 1993.

DUBEY, J.P. Life cycle of *Isoospora rivolta* (Grassi, 1879) in cats and mice. *Journal of Protozoology*, v. 26, n. 3, p. 433-443. 1979.

DUBEY, J.P. Reshedding of *Toxoplasma* oocysts by chronically infected cats. *Nature*, v. 262, n. 5565, p. 213-214, 1976.

DUBEY J.P. Toxoplasma, Hammondia, Besnoitia, Sarcocystis, and Other Tissue Cyst-Forming Coccidia of Man and Animals, In DUBEY, J.P. Parasitic Protozoa., vol. 3, New Yourk Academic press, p.101-237, 1977.

DUBEY, J.P.; FRENKEL, J.K. Extra-Intestinal stages of *Isoospora felis* and *I. rivolta* (Protozoa: Eimeriidae) in cats. *Journal of Protozoology*, v. 19, n. 1, p. 89-92. 1972.

DUBEY, J.P.; FRENKEL, J.K. Toxoplasmosis of rats: a review with considerations of their values as an animal model and their possible role in epidemiology. *Veterinary Parasitology*, v. 77, n. 1, p. 1-32, 1998.

DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S.; SAVILLE, W.J.A.; REED, S.M.; GRANSTROM, D.E.; SPEER, C.A. A review of *Sarcocystis neurona* and equine protozoal myeloencephalitis (EPM). *Veterinary Parasitology*, v. 95, n. 2-4, p. 89-131, 2001.

DUSZYNSKI, D.W.; COUCH, L.; UPTON, S.J. *Coccidia (Eimeridae) of Canidae and Felidae*, 2000. <<http://biology.unm.edu/biology/coccidia/carniv1.html>> Acesso em: 05 de julho de 2004.

FAYER, R. Epidemiology of protozoan infections: the Coccidia. *Veterinary Parasitology*, v. 6, n. 1-2, p. 75-103, 1980.

FAYER, R. Cultivation of feline *Isoospora rivolta* in mammalian cells. *Journal of Parasitology*, v. 58, n. 6, p. 1207-1208, 1972.

FAYER, R.; FRENKEL, J.K. Comparative infectivity for calves of oocysts of feline coccidia: *Besnoitia*, *Hammondia*, *Cystoisospora*, *Sarcocystis* and *Toxoplasma*. *Journal of Parasitology*, v. 65, n. 5, p. 756-762. 1979.

FAYER, R.; THOMPSON, D.E. *Isoospora felis*: development in cultured cells with some cytological observations. *Journal of Parasitology*, v. 60, n. 1, p. 160-168, 1974.

- FERGUSON, D.J.P.; BIRCH-ANDERSEN, A.; HUTCHINSON, W.M.; SIIM, J.C. Ultrastructural observations showing enteric multiplication of *Cystoisospora* (*Isospora*) *felis* by endodiogeny. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, v. 63, n. 3, p. 289-291, 1980.
- FLAUSINO, W.; SOARES, C.O.; FREIRE, R.B.; LOPES, C.W.G. Variações intraespecíficas de taquizoítas de *Toxoplasma gondii* (Apicomplexa: Toxoplasmatinae) isolados de uma infecção natural e comparadas frente à cepa congênita. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, v. 4, n. 3, p. 13-17, 1997.
- FRANZEN, C; MULLER, A.; BIALEK, R.; DIEHL, V.; SALZBERGER, B.; FATKENHEUER, G. Taxonomic position of the human intestinal protozoan parasite *Isospora belli* as based on ribosomal RNA sequences. *Parasitology Research*, v.86, p. 669-676, 2000.
- FREIRE, R.B.; LOPES, C.W.G. Distribuição de hipnozoítas de *Cystoisospora felis* (Wenyon, 1923) Frenkel, 1977 (Apicomplexa: Sarcocystieda) em camundongos albinos experimentalmente infectados. *Revista Brasileira Parasitologia Veterinária*, v. 5, n. 1, p. 23-28, 1996.
- FREIRE, R.B.; LOPES, C.W.G. Infecção experimental em camundongos neonatos com esporozoítas de *Cystoisospora felis* (Wenyon, 1923) Frenkel, 1977 (Apicomplexa: Sarcocystieda). *Revista Brasileira Ciência Veterinária*, v. 2, n. 1, p. 33-34. 1995a.
- FREIRE, R.B.; LOPES, C.W.G. Avaliação da digestão enzimática por pepsina e tripsina na obtenção de hipnozoítas de *Cystoisospora felis* (Wenyon, 1923) Frenkel, 1977 (Apicomplexa: Sarcocystieda). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 4, n. 1, p. 21-23, 1995b.
- FREIRE, R.B.; LOPES, C.W.G. *In vitro* excystation of *Cystoisospora felis* (Wenyon, 1923) Frenkel, 1977 (Apicomplexa: Sarcocystieda). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 4, n. 1, p. 15-19, 1995c.
- FRENKEL, J.K. Infections with organisms resembling *Toxoplasma*, together with the description of a new organism: *Besnoitia jellisoni*. *Atti VI Congresso Internazionale di Microbiologia*, v. 5, p. 426-434, 1953.
- FRENKEL, J.K. *Besnoitia wallacei* of cats and rodents: with a reclassification of other cyst-forming isosporoid coccidia. *Journal of Parasitology*, v. 63, n. 4, p. 611-628. 1977.
- FRENKEL, J.K.; DUBEY, J.P. Rodents as vectors for feline Coccidia, *Isospora felis* and *Isospora rivolta*. *Journal of Infectious Diseases*, v. 125, n. 1, p. 69-72. 1972.
- FRENKEL, J.K.; SILVA, M.B. de O., SALDANHA, J.C., SILVA-VERGARA, M.L. de, CORREIA, D., BARATA, C.H., SILVA, E.L., RAMIREZ, L.E., PRATA, A. Presença extra-intestinal de cistos unizóicos de *Isospora belli* em paciente com SIDA. Relato de caso. *Revista da Sociedade Brasileira Medicina Tropical*, v. 36, n. 3, p. 409-412, 2003.
- FRENKEL, J.K.; SMITH, D.D. Determination of the genera of cyst-forming coccidia. *Parasitology Research*, v. 91, n. 5, p. 384-389, 2003.

- GENNARI, S.M.; KASAI, N.; PENA, H.F. de J.; CORTEZ, A. Ocorrência de protozoários e helmintos em amostras de fezes de cães e gatos da cidade de São Paulo. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 36, n. 2, p. 87-91, 1999.
- GOLDMAN, M.; CARVER, R.K.; SULZER, A. J. Similar internal morphology of *Toxoplasma gondii* and *Besnoitia jellisoni* stained with silver protein. *Journal of Parasitology*, v. 43, n. 4, p. 490-491, 1957.
- GRANSTROM, D.E.; DUBEY, J.P.; DAVIS, S.W.; FAYER, R.; FOX, J.C.; POONACHA, K.B.; GILES, R.C.; COMER, P.F. Equine protozoal myeloencephalitis: antigen analysis of cultured *Sarcocystis neurona* merozoites. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 5, n. 1, p. 88-90, 1993.
- GUTIÉRREZ, F., ARDAY, L. Cultivo de *Cystoisospora felis* Frenkel, 1977 (*Isospora felis* Wasielewski, 1904, Wenyon, 1923) en la membrana corioalantoidea de embrión de pollo. *Acta Científica Venezolana*, v. 38, n. 6, p. 474-483, 1987.
- HEINE, J. Die tryptische Organverdauung als Methode zum nachweis extraintestinaler Stadien bei *Cystoisospora* spp. – Infektionen. *Berliner und Munchener Tierärztliche Wochenschrift*, v. 94, n. 6, p. 103-104, 1981.
- HIETALA, S.K., THURMOND, M.C. Postnatal *Neospora caninum* transmission and transient serologic responses in two dairies. *International Journal for Parasitology*, v. 29, n. 10, p. 1669-1676, 1999.
- HILALI, M.; FATANI, A.; AL-ATIYA, S. Isolation of tissue cysts of *Toxoplasma*, *Isospora*, *Hammondia* and *Sarcocystis* from camel (*Camelus dromedarius*) meat in Saudi Arabia. *Veterinary Parasitology*, v. 58, n. 4, p. 353-356, 1995.
- HITCHCOCK, D.J. The life cycle of *Isospora felis* in the kitten. *Journal of Parasitology*, v. 41, p. 383-393, 1955.
- KASPER, L.H.; CRABB, J.H.; PFEFFERKORN, E.R. Purification of a major membrane protein of *Toxoplasma gondii* by immunoabsorption with a monoclonal antibody. *Journal of Immunology*, v. 130, n. 5, p. 2407-2412, 1983.
- KASPER, L.H.; BRADLEY, M.S.; PFEFFERKORN, E.R. Identification of stage-specific sporozoite antigens of *Toxoplasma gondii* by monoclonal antibodies. *Journal of Immunology*, v. 132, n. 1, p. 443-449, 1984.
- KASPER, L.H.; WARE, P.L. Recognition and characterization of stage-specific oocyst/sporozoite antigens of *Toxoplasma gondii* by human antisera. *Journal of Clinical Investigation*, v. 75, n. 5, p. 1570-1577, 1985.
- KOWALIK, S.; ZAHNER, H. *Eimeria separata*: method for the excystation of sporozoites. *Parasitology Research*, v. 85, n. 6, p. 496-499, 1999.

- KURIEN, T.B.; SCOFIELD, R.H. Protein blotting: a review. *Journal of Immunological methods*, n. 274, p. 1-15, 2003.
- KUTTIN, E.S.; KALLER, A. *Cystoisospora israeli* n. sp. causing enteritis in a South African fur seal. *Aquatic Mammals*, v. 18, n. 3, p. 79-81, 1992.
- KUTTIN, E.S.; KALLER, A. *Cystoisospora delphini* n. sp. causing enteritis in a bottlenosed dolphin (*Tursiops truncatus*). *Aquatic Mammals*, v. 22, n. 1, p. 57-59, 1996.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, n. 259, p. 680-685, 1970.
- LEEK, R.G.; FAYER, R. Survival of sporocysts of *Sarcocystis* in various media. *Proceedings of Helminthology Society of Washington*, v. 46, n. 1, p. 151-154, 1979.
- LEVINE, N.D. *Veterinary Protozoology*. 1st ed. Ames: Iowa State Univ. Press, 1985. 414 p.
- LIN, D.S.; LAI, S.S.; BOWMAN, D.D.; JACOBSON, R.H.; BARR, M.C.; GIOVENGO, S.L. Feline immunodeficiency virus, feline leukaemia virus, *Toxoplasma gondii* and intestinal parasitic infections in Taiwanese cats. *British Veterinary Journal*, v. 146, n. 5, p. 468-475, 1990.
- LINDSAY, D.S.; BLAGBURN, B.L. Biology of mammalian *Isoospora*. *Parasitology Today*, v. 10, n. 6, p. 214-220, 1994.
- LOSS, Z.G.; LOPES, C.W.G. Alguns aspectos clínicos da infecção por *Cystoisospora felis* (Wenyon, 1926) Frenkel, 1977 (Apicomplexa: Cystoisosporinae) em gatos. *Arquivos da Universidade Federal Rural Rio de Janeiro*, v. 15, n. 1, p. 79-84, 1992a.
- LOSS, Z.G.; LOPES, C.W.G. Efeito da infecção experimental por *Cystoisospora felis* (Apicomplexa: Cystoisosporinae) no ganho de peso de camundongos. *Arquivos da Universidade Federal Rural Rio de Janeiro*, v. 15, n. 1, p. 109-111, 1992b.
- LOSS, Z.G.; LOPES, C.W.G. Tratamento durante a gestação e no período pós-parto com sulfadiazina associada a pirimetamina de gatas portadoras de infecção natural por *Cystoisospora felis* (Wenyon, 1923) e *C. rivolta* (Grassi, 1879) (Apicomplexa: Cystoisosporinae). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 6, n. 1, p. 57-60, 1997.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.
- LUNDE, M.N.; JACOBS, L. Antigenic relationship of *Toxoplasma gondii* and *Besnoitia jellisoni*. *Journal of Parasitology*, v. 51, n. 2, p. 273-276, 1965.
- MARKUS, M.B. Terminology for invasive stages of protozoa of the subphylum Apicomplexa (Sporozoa). *South African Journal of Science*, v. 74, n. 2, p. 105-106. 1978.

- MASSAD, F.V.; OLIVEIRA, F.C.R.; ALBUQUERQUE, G.R.; LOPES, C.W.G. Hipnozoítas de *Cystoisospora ohioensis* (Dubey, 1975) Frenkel, 1977 (Apicomplexa: Cystoisosporinae) em frangos. *Revista Brasileira Ciências Veterinárias*, v. 10, n. 1, p. 57-58, 2002.
- MAYHEW, I.G.; DELLERS, R.W.; TIMONEY, J.F.; KEMEN, M.J.; FAYER, R.; LUNDE, M.N. *Microbiology and serology*. In: MAYHEW, I.G.; DE LAHUNTA, A.; WHITLOCK, R.H.; KROOK, L.; TASKER, J.B. Spinal cord disease in the horse. *Cornell Veterinarian*, v. 68 (Suppl. 6), p. 148-160, 1978.
- MCKENNA, P.B.; CHARLESTON, W.A.G. Activation e excystation of *Isospora felis* and *Isospora rivolta* sporozoites. *Journal of Parasitology*, v. 68, n. 2, p. 276-286, 1982.
- MEHLHORN, H.; MARKUS, M.B. Electron microscopy of stages of *Isospora felis* of the cat in the mesenteric lymph node of the mouse. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, v. 51, n. 1, p. 15-24, 1976.
- MELO, P.S.; CARVALHO FILHO, P.R.; FLAUSINO, W.; LOPES, C.W.G. Hypnozoites of *Cystoisospora felis* (Wenyon, 1923) Frenkel, 1977 (Apicomplexa: Cystoisosporinae) in swine (*Sus scrofa domestica*) viscera: a new intermediate host, *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 12, n. 3, p. 103-107, 2003.
- MUNDHENKE, H.; DAUGSCHIES, A. Untersuchungen zum Vorkommen von Endoparasiten bei der Katze in Hannover und seinem Umland. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift*, v. 86, n. 2, p. 43-48, 1999.
- NEMESËRI, L. Beitrage zur etiologie der coccidiose der Hunde. I. *Isospora canis* sp. n. *Acta Veterinaria Hungarica*, v. 10, p. 95-99, 1960.
- NICHOL, S.; BALL, S.J.; SNOW, K.R. Prevalence of intestinal parasites in feral cats in some urban areas of England. *Veterinary Parasitology*, v. 9, n. 2, p. 107-110, 1981.
- OGINO, N.; YONEDA, C. The fine structure and mode of division of *Toxoplasma gondii*. *Archives of Ophthalmology*, v. 75, n. 2, p. 218-227, 1966.
- OLIVEIRA, F.C.R.; ALBUQUERQUE, G.R.; LOPES, C.W.G.; MASSAD, F.V.; MUNHOZ, A.D. Hipnozoítas de *Cystoisospora ohioensis* (Dubey, 1975) Frenkel, 1977 (Apicomplexa: Cystoisosporinae) recuperados de órgãos de camundongos através da digestão péptica. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.10, n.1, p.29-35, 2001.
- OMATA, Y.; OIKAWA, H.; KANDA, M.; MIKAZUKI, K.; TAKEHARA, T.; VENTURINI, C.; SAITO, A.; SUZUKI, N. Enhancement of humoral immune response of *Isospora felis*-infected cats after inoculation with *Toxoplasma gondii*. *Journal of Veterinary Medicine Science*, v. 53, n. 1, p. 163-165, 1991a.

- OMATA, Y.; OIKAWA, H.; KANDA, M.; MIKAZUKI, K.; CLAVERIA, F.G.; DILORENZO, C.; TAKEHARA, T.; SAITO, A.; SUZUKI, N. Humoral immune response to *Isoospora felis* and *Toxoplasma gondii* in cats experimentally inoculated with *Isoospora felis*. *Journal of Veterinary Medicine Science*, v. 53, n. 6, p. 1071-1073, 1991b.
- PATTON, S.; RABINOWITZ, A.R. Parasites of wild felidae in Thailand: a coprological survey. *Journal of Wildlife Disease*, v. 30, n. 3, p. 472-475, 1994.
- RASCHKA, C.; HAUPT, W.; RIBBECK, R. Untersuchungen zum Endoparasitenbefall bei streuenden katzen. *Monatshefte Veterinarmedizin*, v. 49, n. 7, p. 307-315, 1994.
- REESE, N.C.; CURRENT, W.L.; ERNST, J.V.; BAILEY, W.S. Cryptosporidiosis of man and calf: a case report and results of experimental infections in mice and rats. *American Journal of Tropical Medicine*, v. 31, n. 2, p. 226-229, 1982.
- ROCHA, E.M. da; LOPES, C.W.G. Comportamento da *Isoospora canis*, *Isoospora felis* e *Isoospora rivolta* em infecções experimentais em cães e gatos. *Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro*, v. 1, n. 1, p. 65-70, 1971.
- SAMARASINGHE, B.; JOHNSON, J.; RYAN, U. Phylogenetic analysis of *Cystoisospora* species at the rRNA ITS1 locus and development of a PCR-RFLP assay. *Experimental Parasitology*, v. 118, p. 592-595, 2008.
- SAMPAIO, I.B.M. *Estatística Aplicada à Experimentação Animal*. Belo Horizonte: Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte, 2002. 265 p.
- SANTORO, F.; AFCHAIN, D.; PIERCE, R.; CESBRON, J. Y.; OVLAQUE, G.; CAPRON, A. Serodiagnosis of *Toxoplasma* infection using a purified parasite protein (P30). *Clinical Experimental Immunology*, v. 62, n. 2, p. 262-269, 1985.
- SANTOS, J.A.; STABENOW, C.S.; OLIVEIRA, F.C.R. de; LOPES, C.W.G. Cistoosporose em gatos de rua do município de Campos dos Goytacazes, RJ. *CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, Anais...* Rio de Janeiro: CBPV, 12 Janeiro, 2002 1 CD-ROM.
- SCHOLTYSECK, E. Ultrastructure. In: HAMMOND, D.M.; LONG, P.L. *The Coccidia*. Baltimore: Univ. Park Press, p. 81, 1973.
- SHAH, H.L. The life cycle of *Isoospora felis*, Wenyon, 1923, a coccidium of the cat. *Journal of Protozoology*, v. 18, n. 1, p. 3-17, 1971.
- SHEFFIELD, H.G.; MELTON, M.L. The fine structure and reproduction of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Parasitology*, v. 54, n. 2, p. 209-226, 1968.
- SHEFFIELD, H.G.; MELTON, M.L. *Toxoplasma gondii*: the oocyst, sporozoite, and infection of cultured cells. *Science*, v. 167, n. 37, p. 892-893, 1972.

- SHIBALOVA, T.A.; PETRENKO, V.I. [*Isospora bigemina*: sporozoite-induced development of the life cycle in tissue culture.] *Parazitologiya*, v. 6, n. 6, p. 201-205, 1972 [em russo].
- SMITH, D. D. The Sarcocystidea: *Sarcocystis*, *Frenkelia*, *Toxoplasma*, *Besnoitia*, *Hammondia* and *Cystoisospora*. *Journal of Protozoology*, v. 28, n. 2, p. 262-266, 1981.
- SMITH, R.R.; RUFF, M.D. A rapid technique for the cleaning and concentration of *Eimeria* oocysts. *Poultry Science*. v. 54, n. 6, p. 2081-6, 1975
- SPEER, C.A.; DUBEY, J.P.; MCALLISTER, M.M.; BLIXT, J.A. Comparative ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites and tissue cysts of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology*, v. 29, n. 10, p. 1509-1519, 1999.
- STIBBS, H.H.; ONGERTH, J.F. Immunofluorescence detection of *Cryptosporidium* oocysts in fecal smears. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 24, n. 4, p. 517-521, 1986.
- SUGGS, M., WALLS, K.W., KAGAN, I.G. Comparative antigenic study of *Besnoitia jellisoni*, *B. panamensis* and five *Toxoplasma gondii* isolates. *Journal of Immunology*, v. 101, n. 1, p.166-175, 1968.
- TAYLOR, W.P.; EVANS, C.B.; ALEY, S.B.; BAUTA, J.R.; DANFORTH, H.D. Identification of an apically-located antigen that is conserved in sporozoan parasites. *Journal of Protozoology*, v. 37, n. 6, p. 540-546, 1990.
- TEIXEIRA, M.; ALBUQUERQUE, G.R.; LOPES, C.W.G.; FLORENTINO, M.V.N. An adeleid coccidian, a pseudoparasite of *Didelphis aurita* (Marsupialia: Didelphoidea). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 12, n. 1, p. 43-45, 2003.
- TENTER, A.M. Current research on *Sarcocystis* species of domestic animals. *International Journal for Parasitology*, v. 25, n. 11, p. 1311-1330, 1995.
- TENTER, A.M.; BARTA, J.R.; BEVERIDGE, I.; DUSZYNSKI, D.W.; MEHLHORN, H.; MORRISON, D.A.; THOMPSON, R.C.A.; CONRAD, P.A. The conceptual basis for a new classification of the coccidia. *International Journal for Parasitology*, v. 32, n. 5, p. 595-616, 2002.
- TEREJO, F.; ARCAJ-DE-PERAZA, L. *Cystoisospora felis*: initial penetrative ability into cell cultures from rat peritoneal exudate. *Acta Científica Venezolana*, v. 33, n. 6, p. 338-341, 1982.
- TILLEY, M.; UPTON, J.S.; BLAGBURN, B.L.; ANDERSON, B.C. Identification of Outer Oocyst Wall Proteins of Three *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) Species by ¹²⁵I Surface Labeling. *Infection and Immunity*, v. 58, n. 1, p. 252-253, 1990.
- TOMIMURA, T. Experimental studies on coccidiosis in dog and cats sporogony of *Isospora felis* and its artificial infection in cats. *Japanese Journal of Parasitology*, v. 6, n. 1, p. 12-24. 1957.

- TOWBIN H, STAHELIN J, GORDON J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, v. 76, p. 4350-4, 1979.
- TOYAMA, T.; TSUNODA, K.; FUJITA, J. Excystation of *Isospora felis* oocysts and *I. ohioensis* sporocysts *in vitro*. *Japanese Journal of Veterinary Science*, v. 44, n. 6, p. 971-973, 1982.
- TRUONG, Q.; FERRARI, B.C. Quantitative and qualitative comparisons of *Cryptosporidium* faecal purification procedures for the isolation of oocysts suitable for proteomic analysis. *International Journal for Parasitology*, v. 36, p. 811-819, 2006.
- VANPARIJS, O.; HERMANS, L.; van der FLAES, L. Helminth and protozoan parasites in dogs and cats in Belgium. *Veterinary Parasitology*, v. 38, n. 1, p. 67-73, 1991.
- VERHOFSTEDDE, C.; VAN GELDER, P.; RABAEY, M. The infection-stage-related IgG response to *Toxoplasma gondii* studied by immunoblotting. *Parasitology Research*, v. 74, n. 6, p. 516-520, 1988.
- WARE, P.L.; KASPER, L.H. Strain-specific antigens of toxoplasma gondii. *Infection and Immunity*, v. 55, n. 3, p. 778-783, 1987.
- WENYON, C.M. Coccidiosis of cats and dogs and the status of the *Isospora* of man. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, v. 17, n. 1, p. 231-288, 1923.

7 ANEXOS

ANEXO – 1

NOTA DE PESQUISA

AVALIAÇÃO DO INTESTINO DELGADO E LINFONODOS MESENTÉRICOS DE CÃES (*Canis familiaris*) INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE COM *Sarcocystis cruzi* (HASSELMAN, 1923) WENYON, 1926 (APICOMPLEXA: SARCOCYSTIDAE) *

GISELE S. DE MEIRELES¹ ELAN C. PAES-DE-ALMEIDA²; PAULO ROBERTO CARVALHO FILHO¹; WALTER FLAUSINO³; JANAINA DA S. RODRIGUES¹; ANA MARIA R. FERREIRA⁴ CARLOS WILSON G. LOPES³,

ABSTRACT:- MEIRELES, G.S. DE; PAES-DE-ALMEIDA, E.C.; CARVALHO FILHO, P.R. DE; FLAUSINO, W.; RODRIGUES, J. DA S.; FERREIRA, A.M.R.; LOPES, C.W.G. [Evaluation of small intestine and mesenteric lymph nodes of dogs (*Canis familiaris*) experimentally infected by *Sarcocystis cruzi* (Hasselman, 1923) Wenyon, 1926 (Apicomplexa: Sarcocystidae).] Avaliação do intestino delgado e linfonodos mesentéricos de cães (*Canis familiaris*) infectados experimentalmente com *Sarcocystis cruzi* (Hasselman, 1923) Wenyon, 1926 (Apicomplexa: Sarcocystidae). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 17, supl.1, p. 00-00, 2008. Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária, UFRRJ, 23890-000 Seropédica, RJ. E-mail: lopescwg@ufrj.br

Species of the genus *Sarcocystis* are considered as important parasites of domestic animals. Dogs are considered as definitive host for a variety species of *Sarcocystis*, when they fed on intermediated host tissues cysts shed sporocysts in their feces. Grinded bovine cardiac muscles, positive for *Sarcocystis cruzi* was given to two puppies free of coccidia. Both animals shed sporocysts in their feces at 12 days after infection (DAI). These sporocysts measured 17.44 ± 0.82 11.60 ± 0.66 μm with shape index of 1.50 ± 0.05 . At 23

* Sob os auspícios do CNPq.

¹, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), 23890-000 Seropédica RJ, E-mail: giselesm@ufrj.br , carvalhofilho@gmail.com e jajasoledad@gmail.com - bolsistas Capes e CNPq.

² Universidade do Grande Rio e Programa de Pós-graduação em Patologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal Fluminense (UFF), Niterói, RJ, Brasil, CEP.: 24.440-370, E-mail: elancardo@superig.com.br

³ Departamento de Parasitologia Animal, IV, UFRRJ, Itaguaí RJ. – bolsista CNPq. E-mail: flausino@ufrj.br e lopescwg@ufrj.br

⁴ Departamento de Patologia e Clínica Veterinária, Faculdade de Veterinária, UFF, Vital Brazil. Niterói, RJ. E-mail: anaferreira@pq.cnpq.br – bolsista CNPq

DAI, these animals were posted and samples of the small intestine, such as: duodenum, jejunum, ileum and mesenteric lymph nodes were collected. In the analysis of small intestine, sporocysts were observed under de mucosa and they were characterized by sporulated sporocysts with sporozoites. Lesions were consisted of discrete edema and plasmocytic cells infiltrations which they were associated to a minimal inflammatory reaction in the presence of parasitic stages. On the other hand, sporocysts were observed at the cortical region near of lymphatic vessels adjacent to mesenteric lymph nodes capsule. It indicated the involvement of the lymphatic vessels in the sporocysts dispersion in the dog mesenteric lymph nodes.

KEY WORDS: *Sarcocystis*, dogs, small intestine, mesenteric lymph nodes, histopathology.

RESUMO

Espécies do gênero *Sarcocystis* são consideradas com importantes parasitos dos animais domésticos. Cães são considerados com hospedeiros definitivos para uma variedade de espécies de *Sarcocystis*, quando estes se alimentam de cistos teciduais dos hospedeiros intermediários eliminam em suas fezes esporocistos. Amostras de musculatura cardíaca positivas para sarcocistos de *S. cruzi* foram dados a dois cachorrinhos livres de coccídios, eles eliminaram em suas fezes esporocistos aos 12 dias após infecção (DAI). Estes esporocistos mediram $17,44 \pm 0,82$ $11,60 \pm 0,66$ μm com índice morfométrico de $1,50 \pm 0,05$. Aos 23 DAI, estes animais foram necropsiados e amostras do intestino delgado como duodeno, jejuno, íleo e linfonodos mesentéricos foram coletadas. Na análise do intestino delgado, esporocistos foram observados abaixo da mucosa e caracterizados como esporulados contendo esporozoítos. As lesões foram constituídas por um discreto edema e

infiltração plasmocitária o que está relacionado a uma mínima reação inflamatória pela presença das fases parasitárias. Por outro lado, esporocistos esporulados também foram observados na região cortical próximo a vasos linfáticos adjacentes a cápsula dos linfonodos mesentéricos. Isto indica que há participação dos vasos linfáticos na dispersão dos esporocistos nos linfonodos mesentéricos de cães.

PALAVRAS-CHAVES: *Sarcocystis*, cães, intestino delgado, linfonodos mesentéricos, histopatologia.

A sarcocistose vem sendo considerada como uma importante doença parasitária do sistema vascular nos animais de produção (LOPES, 2004; LOPES et al., 2005) sendo que algumas espécies da família Sarcocystidae são consideradas como zoonose emergente (SLIFKO et al., 2000). *Sarcocystis* é um gênero que possui como hospedeiros definitivos (HD) predadores carnívoros e onívoros, em especial o cão e o gato, e como hospedeiros intermediários (HI), herbívoros ou onívoros, especialmente ruminantes (DUBEY, 1976; FIGUEIREDO et al., 1991; TENTER, 1995; LOPES, 2004). Os HI adquirem a infecção por ingestão de esporocistos ou oocistos esporulados que são eliminados nas fezes do HD infectado, que por sua vez tornam-se infectados por ingestão da forma cística do parasito localizada na musculatura do HI (DUBEY, 1976; TENTER, 1995). As fases do ciclo evolutivo de *Sarcocystis* são bem conhecidas, principalmente em espécies que envolvem animais de produção onde o cão é considerado como HD de espécies de *Sarcocystis* mais patogênicas (LOPES, 2004), entre elas *S. cruzi* em bovinos, *S. levinei* em búfalo, *S. capracanis* e *S. hircicanis* em caprinos, *S. tenella* em ovinos e *S. miescheriana* em suínos (TENTER, 1995; ODENING, 1998). A distribuição da sarcocistose em animais de produção é cosmopolita (LOPES, 2004), porém a prevalência mundial nos cães varia de acordo com o país, período e metodologia utilizada. A recuperação e identificação dos esporocistos de *Sarcocystis* são geralmente realizadas em levantamentos de parasitos intestinais (OLIVEIRA-SEQUEIRA, 2002; FONTANARROSA et al., 2006; LÓPEZ et al., 2006; MARTÍNEZ-MORENO et al., 2006; SAGER et al., 2006). Alguns relatos da observação de esporocistos em cães através de digestão dos linfonodos mesentéricos foram assinalados por Shimura et al. (1981) e por Botelho e Lopes (1984). Este trabalho teve como objetivo descrever a

presença de esporocistos no intestino delgado e linfonodos mesentéricos de cães experimentalmente infectados.

Dois cães desmamados, sem raça definida, de ambos os sexos, dois meses de idade e livres de parasitos foram examinados por 15 dias, antes de serem infectados. Estes animais foram mantidos em gaiolas isoladas próprias para a espécie com água e ração *ad libitum*.

O material infectante foi obtido de um bovino no matadouro de Barra Mansa, RJ e constituído de duas amostras de 100g de triturado de coração de bovino positivo para bradizoítas de *Sarcocystis*. Previamente a trituração do coração bovino, pedaços foram retirados e fixados em formol histológico a 10% para posterior identificação da espécie dos cistos encontrados onde foram compatíveis com a morfologia de *S. cruzi* quando examinados (Figura 1a). As amostras foram dadas a cada um dos cães por via oral. As fezes obtidas destes animais foram examinadas por um período de 23 DAI para pesquisa de esporocistos nas fezes conforme Figueiredo et al. (1991). A seguir os dois animais foram necropsiados com base no Cobeia (2008) onde secções dos linfonodos mesentéricos e do intestino delgado como: duodeno, jejuno e íleo foram separados, fixadas em formol histológico a 10%, emblocadas em parafina e coradas em HE e PAS conforme Behmer et al. (1976) inclusive as amostras de musculatura cardíaca do bovino.

Os cães começaram a eliminação de esporocistos (Figura 1b) nas fezes ao 11^o DAI. A média de eliminação foi de $8,0 \times 10^5$ esporocistos por grama de fezes onde os diâmetros maior e menor mediram em média $17,44 \pm 0,82$ e $11,60 \pm 0,66$ μm respectivamente, com índice morfométrico de $1,50 \pm 0,05$ características compatíveis para esporocistos de *S. cruzi* (figura 1b) conforme Botelho e Lopes (1988) e Figueiredo et al. (1991).

Na análise do intestino delgado foram evidenciadas nos segmentos de mucosa do duodeno, jejuno e íleo congestão, discreto a moderado infiltrado inflamatório linfoplasmocitário, principalmente adjacente às células apicais das criptas intestinais onde havia oocistos esporulados, com esporocistos e esporozoítas de *S. cruzi* (figura 2) localizados no ápice das criptas da mucosa intestinal, abaixo do epitélio de revestimento, onde foram mais bem evidenciados com auxílio do PAS. Hiperplasia de folículo linfóide, havendo focos com migração de células linfóides em direção as criptas intestinais. Os relatos da literatura descrevem lesões e achados microscópicos em hospedeiros intermediários principalmente em herbívoros e onívoros, havendo escassas informações sobre as lesões em hospedeiros definitivos, particularmente cães (SHIMURA et al., 1981; BOTELHO; LOPES, 1984; LOPES,

2004). Existem alguns estudos de *Sarcocystis* em cães que relatam apenas a presença de oocistos e esporocistos no intestino delgado, analisados por microscopia óptica (GARDINER et al., 1988; WADJKAR et al., 1993) inclusive para *S. capracanis*. Os relatos recentes estão associados a levantamento de parasitos gastrintestinais (OLIVEIRA-SEQUEIRA, 2002; FONTANARROSA et al., 2006; LABRUNA et al., 2006; LÓPEZ et al., 2006; SAGER et al., 2006; MARTÍNEZ-MORENO et al., 2007) onde esporocistos de *Sarcocystis* estão assinalados.

Nos linfonodos mesentéricos foram observados na região cortical alguns folículos primários evidentes e na região medular havia rarefação celular. Ainda na região cortical, próximo aos vasos linfáticos aferentes que drenam linfa dos tecidos regionais foram evidenciados na coloração de PAS esporocistos e esporozoítas de *S. cruzi* (Figura 3). Existem poucos relatos da observação de esporocistos em linfonodos mesentéricos de cães (SHIMURA et al., 1981; BOTELHO; LOPES, 1984). Estes autores citam a presença dos esporocistos extra-intestinais em achados por digestão enzimática dos linfonodos mesentéricos sem, contudo observa-los no parênquima dos linfonodos. A investigação desta coccidiose no cão através de análise histológica vem contribuir para o melhor entendimento sobre as localizações teciduais e das alterações patológicas na mucosa do intestino delgado do cão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEHMER, O.A.; TOLOSA, E.M.C. DE; FREITAS NETO, A.G.DE. *Manual de técnicas para histologia normal e patológica*. São Paulo: EDART. 1976. 256p.
- BOTELHO, G.G; LOPES, C.W.G. Esporocistos de *Sarcocystis cruzi* (Apicomplexa: Sarcocystidae) em linfonodos mesentéricos de cães. *Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro*, v. 7, n. 1, p. 87-88, 1984.
- BOTELHO, G.G; LOPES, C.W.G. Aspectos parasitológicos do *Sarcocystis cruzi* (Hasselman, 1926) Wenyon, 1926 (Apicomplexa: Sarcocystidae) em infecções experimentais em cães e bezerros. *Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro*, v. 11, n. 1-2, p. 1-10, 1988.
- COBEA, Legislação e ética. Disponível em: <<http://www.unb.br/ib/cena/COBEA.htm>>. Acesso em: 16 Abr. 2008.

- DUBEY, J.P. A review of *Sarcocystis* of domestic animals and of other coccidia of cats and dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.169, n.10, p.1061-1078, 1976.
- FIGUEIREDO, P.C.; LOPES, C.W.G.; SERRA-FREIRE, N.M. Espécies do Gênero *Sarcocystis* Lankester, 1882 (Apicomplexa: Sarcocystidae) parasitas de ruminantes domésticos que tem o cão como hospedeiro definitivo. *Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro*, v. 14, n. 1, p.01-12, 1991.
- FONTANARROSA MF, VEZZANI D, BASABE J, EIRAS DF. Na epidemiological study of gastrointestinal parasites of dogs from Southern Greater Buenos Aires (Argentina): Age, gender, breed, mixed infections, and seasonal and spatial patterns. *Veterinary Parasitology*, v. 136, n. 3-4, p. 283-95, 2006.
- GARDINER, C.H.; FAYER, R.; DUBEY, J.P. *An atlas of protozoan parasites in animal tissues*. Agriculture handbook n^o 651. Beltsville: ARS. 1988. 83p.
- LABRUNA, M.B.; PENA, H.F.J. ; SOUZA, S.L.P.; PINTER, A.; SILVA, J.C.R. DA; RAGOZO, A.; CAMARGO, L.M.A.; GENNARI, S.M. Prevalência de endoparasitas em cães da área urbana do município de Monte Negro, Rondônia. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 73, n. 2, p. 183-193, 2006.
- LOPES, C.W.G. O gênero *Sarcocystis* (Lankester, 1882) (Apicomplexa: Sarcocystidae), uma questão a ser reavaliada no Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária.*, v.13, supl.1, p.14-16, 2004
- LOPES, C.W.G., SÁ, W.F. DE; BOTELHO, G.G. Lesões em vacas mestiças gestantes, infectadas experimentalmente com *Sarcocystis cruzi* (Hasselman, 1923) Wenyon, 1926 (Apicomplexa: Sarcocystidae). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária.*, v.14, n. 2, p. 79-83, 2005.
- LÓPEZ, D.J.; ABARCA, V.K.; PAREDES, M.P.; INZUNZA, T.E. Intestinal parasites in dogs and cats with gastrointestinal symptoms in Santiago, Chile. *Revista de Medicina de Chile*, v.134, n.2, p. 193-200, 2006.
- MARTÍNEZ-MORENO, F.J.; HERNÁNDEZ, S.; LÓPEZ-COBOS, E.; BECERRA, C.; ACOSTA, I.; MARTÍNEZ-MORENO, A. Estimation of canine intestinal parasites in Córdoba (Spain) and their risk to public health. *Veterinary Parasitology*, v. 143, n. 1, p. 7- 13, 2007.

- ODENING, K. The present state of species-systematics in *Sarcocystis* Lankester, 1882 (Protista, Sporozoa, Coccidia). *Systematic Parasitology*, v. 41, n. 3, p. 209–233, 1998
- [OLIVEIRA-SEQUEIRA, T.C.; AMARANTE, A.F.; FERRARI, T.B.; NUNES, L.C.](#); Prevalence of intestinal parasites in dogs from São Paulo State, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 103, n.1-2, p.19-27, 2002.
- SAGER, H.; MORET, C.S.; MÜLLER, N.; STAUBLI, D.; ESPOSITO, M.; SCHARES, G.; HÄSSIG, M.; STÄRK, K.; GOTTSTEIN, B.; Incidence of *Neospora caninum* and other intestinal protozoan parasites in populations of Swiss dogs. *Veterinary Parasitology*, v. 139, n. 1-3, p. 84-92, 2006.
- SHIMURA, E.; ITO, S.; TSUNODA, K. Sporocysts of *Sarcocystis cruzi* in mesenteric lymph nodes of dogs. *National Institute of Animal Health Quarterly*, v. 21, n. 2, p. 186-187, 1981.
- SLIFKO, T.R.; SMITH, H.V.; ROSE, J.B. Emerging parasite zoonoses associated with water and food. *International Journal for Parasitology*, v. 30, n. 12-13, p.1379-1393, 2000.
- TENTER, A.M. Current research on *Sarcocystis* species of domestic animals. *International Journal for Parasitology*, v. 25, n. 11, p.1311-1330, 1995.
- WADAJKAR, S.V.; SHASTRI, U.V.; NARLADKAR, B.W. A note on the development of *Sarcocystis capracanis* in pups. *Journal of Veterinary Parasitology*, v.7, n.2, p. 121-123, 1993.

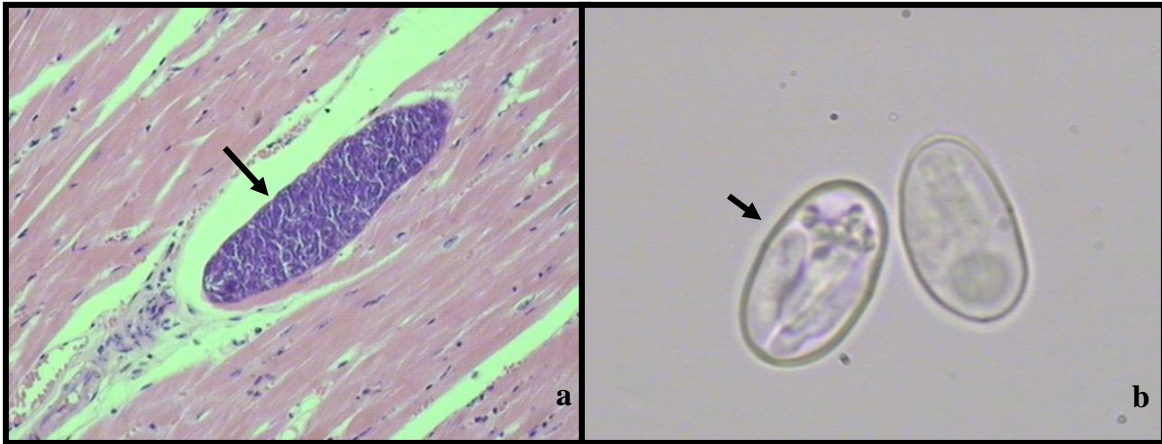


Figura 1. *Sarcocystis cruzi*. Cisto (→) localizado em musculatura cardíaca de um bovino (a). H.E., 100X. Esporocistos (→) (b) Solução saturada de açúcar. 1000X.

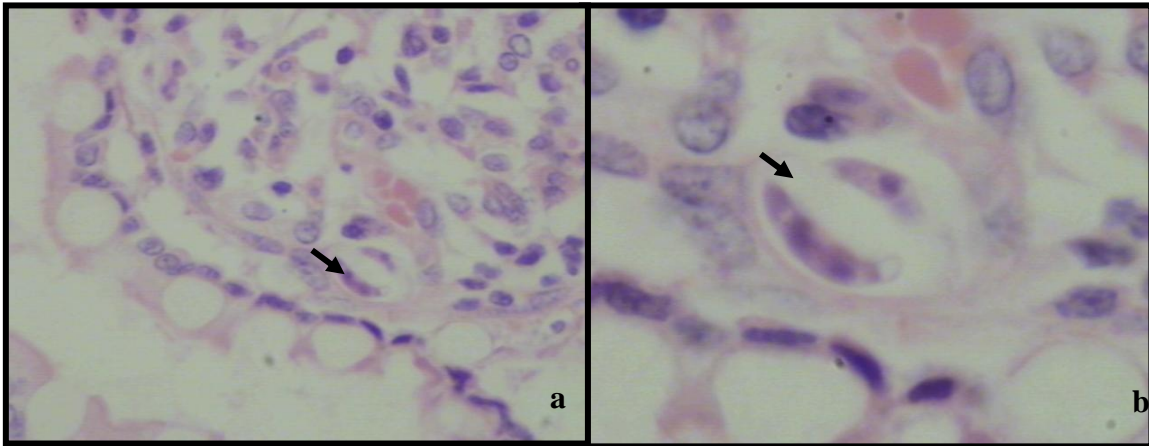


Figura 2. *Sarcocystis cruzi*. . Presença de esporocistos (→) abaixo da mucosa intestinal do íleo de um cão (a). 400X. Aumento maior da figura 2a (b). 1000X. PAS.

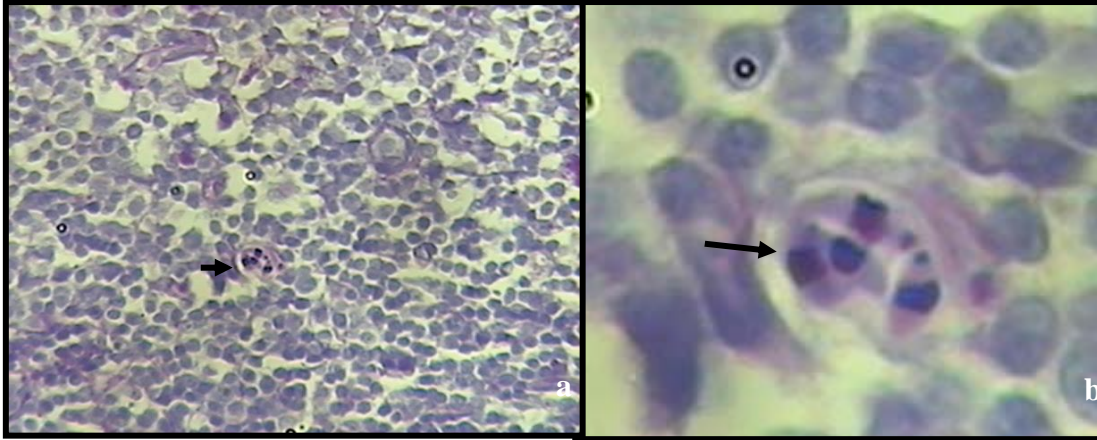


Figura 3. *Sarcocystis cruzi*. Esporocisto (→) na córtex de um linfonodo mesentérico de cão. (a) 400X. Aumento maior da figura 3a (b). 1000X. PAS.