

# AVALIAÇÃO DA DIGESTÃO ENZIMÁTICA POR PEPSINA E TRIPSINA NA OBTENÇÃO DE HIPNOZOÍTAS DE *CYSTOISOSPORA FELIS* (WENYON, 1923) FRENKEL, 1977 (APICOMPLEXA: SARCOCYSTIDAE)

RONALD BASTOS FREIRE<sup>1</sup> & CARLOS WILSON G. LOPES<sup>2</sup>

(1) Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, IV. (2) Departamento de Parasitologia Animal, IB. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Km 47 da Antiga Estrada Rio São Paulo - 23.851-970, Seropédica - RJ, Brasil. Projeto Sanidade Animal (EMBRAPA/UFRRJ).

**SUMÁRIO:** Neste trabalho, foram realizados experimentos visando determinar a influência da digestão enzimática sobre a viabilidade, infectividade e quantidade de hipnozoítas de *Cystoisospora felis* recuperados a partir de camundongos albinos experimentalmente infectados. Para tanto, comparou-se a digestão triptica com a digestão péptica de vísceras contendo o parasita. Hipnozoítas de *C. felis* mantiveram-se viáveis, tanto em solução de tripsina, como em solução de pepsina, durante pelo menos duas horas. A quantidade de hipnozoítas recuperados após digestão péptica foi sempre superior àquela obtida após digestão triptica, quando se utilizou pepsina para a digestão de vísceras contendo o parasita.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Cystoisospora felis*, hipnozoítas, digestão enzimática, pepsina, tripsina.

## INTRODUÇÃO

A digestão enzimática de vísceras contendo cistos de coccídias tem sido amplamente utilizada (FAYER & FRENKEL, 1979; BRÖSIGKE, 1981; SPEER, 1983).

O insucesso em se demonstrar a patogenicidade de *Cystoisospora felis* (FAYER & FRENKEL, 1979; FAYER, 1980; BRÖSIGKE, 1981; BRÖSIGKE *et alii*, 1982), em contraste com os achados clínicos de LOSS (1991), sugeriram a possibilidade de haver uma ação deletéria no processo de digestão triptica, capaz de alterar as características biológicas (viabilidade e infectividade) do parasita.

SHARMA & DUBEY (1981) desenvolveram estudo quantitativo para avaliação da viabilidade e infectividade de formas císticas de *Toxoplasma gondii*, através de digestão péptica ou triptica. Embora não se tenha detectado nenhuma alteração em bradizoítas ou taquizoítas de *T. gondii* oriundos de digestão péptica, a digestão triptica foi responsável por alterações nestas formas parasitárias.

Uma vez que, até o presente, todos os experimentos realizados com *C. felis* em sua forma extra-intestinal foram oriundos da digestão triptica de vísceras de hospedeiros infectados, muitos aspectos não foram devidamente esclarecidos, provavelmente em decorrência da ação deletéria do processo de digestão empregado.

Neste trabalho procurou-se estabelecer o melhor procedimento a ser utilizado na obtenção de hipnozoítas de *C. felis*. Para tanto, os processos de digestão triptica e péptica foram avaliados comparativamente.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados três experimentos: o primeiro, relativo à influência da digestão enzimática na quantidade de hipnozoítas, recuperados a partir de vísceras infectadas; o segundo, vinculado à viabilidade das formas parasitárias obtidas através de digestão péptica ou triptica; e o terceiro, vinculado à patogenicidade inerente às formas parasitárias recuperadas.

No primeiro experimento, 10 camundongos foram inoculados por via oral, com  $10^7$  oocistos esporulados de *C. felis* e sacrificados no sétimo dia após a infecção (DAI). Seus baços foram retirados, abertos longitudinalmente e acondicionados em frascos previamente esterilizados.

Sobre cada fragmento de baço, adicionou-se 5 ml de solução isotônica (NaCl 0,85%). Este material foi submetido à ruptura em homogeneizador Potter (Warren-blender tissue grinder - USA), originando homogeneizados, os

quais foram devidamente identificados e acondicionados em Ehrlenmeyers estéreis.

Os Ehrlenmeyers contendo os homogeneizados foram divididos em grupos idênticos e submetidos a um aquecimento prévio a 37°C (Banho-Maria) durante 15 minutos.

Soluções de digestão, previamente aquecidas a 37°C, foram adicionadas aos Ehrlenmeyers, os quais foram incubados a 37°C durante 120 minutos. As concentrações finais das soluções de digestão foram as mesmas preconizadas por JACOBS *et alii* (1960). Foram realizados controles, constituídos de igual volume de salina, ao invés de solução enzimática.

Aliquotas de 1 ml foram retiradas de cada frasco, a intervalos de 30 minutos, durante 120 minutos e processadas de acordo com metodologia descrita para obtenção e quantificação de hipnozoítas, por BRÖSIGKE (1981).

Os experimentos foram realizados com seis repetições, as quais forneceram um número médio de hipnozoítas, recuperados por digestão triptica, em comparação com aqueles recuperados por digestão péptica.

O segundo experimento foi realizado a partir de aliquotas obtidas no experimento inicial, as quais foram processadas de acordo com GEYSEN *et alii* (1991). A viabilidade foi calculada pela contagem de células capazes de incorporar acridina-orange a 0,1%, visualizadas ao microscópio de fluorescência.

O terceiro experimento consistiu na administração de hipnozoítas oriundos de cada um dos processos de digestão a camundongos, por via oral. Neste caso, os inóculos continham igual número de formas parasitárias ajustadas através de cálculo quantitativo previamente determinado (BRÖSIGKE, 1981).

Os camundongos inoculados com  $1 \times 10^4$  hipnozoítas oriundos de cada um dos processos de digestão enzimática pertenciam a grupos de 24 animais, os quais foram sacrificados em lotes de três animais por dia de experimentação, aos 0, 3, 6, 12, 15, 18, 21 e 24 DAI. O número de hipnozoítas provenientes das vísceras (baço, fígado, linfonodos mesentéricos e placas de Peyer) dos animais sacrificados foi calculado em função do processo de digestão que ofereceu melhor rendimento no primeiro experimento, de acordo com a metodologia descrita por BRÖSIGKE (1981).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A obtenção de hipnozoítas a partir da digestão enzimática do baço de camundongos infectados com  $10^7$  oocistos, por via oral, no 7º DAI, indicou ser a tripsina a 0,5%, menos eficiente que a pepsina a 0,52% (Tabela 1).

Tabela 1 - Quantificação de hipnozoítas de *Cryptosporidia felis* obtidos a partir da digestão péptica ou triptica de baço de camundongos inoculados com  $10^7$  oocistos esporulados

Solução de digestão	Nº de hipnozoítas/tempo de digestão em minutos			
	30	60	90	120
Tripsina <sup>a</sup>	17.600	8.400	9.200	Lise
Pepsina <sup>b</sup>	26.000	20.000	16.000	Lise
Controle <sup>c</sup>	0	800	700	800

<sup>a</sup> Tripsina (atividade de 1:250) a 0,5 em salina tamponada pH 7,2.

<sup>b</sup> Pepsina (atividade de 1:10000) a 0,52% (P/V) adicionada de NaCl a 1% de HCl a 1,4%.

<sup>c</sup> Controle diluente de a e de b - os resultados são a média das observações.

A digestão péptica teve um rendimento 1,47 vezes maior nos primeiros 20 minutos, 2,39 vezes maior aos 60 minutos e, 1,78 vezes maior aos 90 minutos de incubação a 37°C.

Aos 120 minutos de incubação, tanto a tripsina quanto a pepsina digeriram em demasia os tecidos, não permitindo uma avaliação adequada da quantidade de hipnozoítas presentes.

A pepsina é uma protease existente no estômago de todos os vertebrados (exceto das carpas). Sua atividade máxima se dá em pH entre 2 e 4, sendo inativada em pH superior a seis. Esta enzima, preferencialmente, catalisa a hidrólise de ligações peptídicas entre dois aminoácidos hidrofóbicos, como fenilalanina/leucina; fenilalanina-fenilalanina e fenilalanina-tirozina. Com exceção das protaminas, queratina, mucina e outras proteínas ricas em carboidratos, a maioria das proteínas é atacada por esta enzima (JAKUBKE & JESCHKEIT, 1981).

A tripsina é uma protease serínica, presente sob a forma de zimogênio (tripsinogênio) no pâncreas de todos os vertebrados. O tripsinogênio é liberado, via ducto pancreático, no duodeno. A conversão de tripsinogênio em tripsina se dá no intestino delgado, pela ação da enteroquinase e de traços de tripsina. Entre todas as endopeptidases digestivas, a tripsina é a que apresenta a mais pronunciada especificidade em relação ao substrato, catalisando a hidrólise das ligações lisina e arginina, bem como em arginil ou lisil derivados, assim como as amidas de lisina e arginina (JAKUBKE & JESCHKEIT, 1981).

Provavelmente, neste experimento, a tripsina tenha atuado em ligações glicoprotéicas, o que não ocorreu com a pepsina que, por sua vez, mantém a integridade de tais estruturas. Este mesmo raciocínio pode ser utilizado para uma análise da presença, ou ausência, da membrana que compõe o vacúolo parasitóforo, que mostrou-se muito mais

frequente (90%) nas formas parasitárias obtidas por digestão péptica, quando comparadas com aquelas por digestão triptica (45%).

A viabilidade mostrou-se bastante pronunciada em ambos os processos de obtenção de hipnozoítas (entre 90 e 97% para os dois procedimentos). Se houve algum processo deletério em função da digestão triptica, este não envolveu a viabilidade dos hipnozoítas recuperados durante o experimento.

A infectividade, por sua vez, foi mais pronunciada nas preparações decorrentes da digestão péptica, onde a contagem de hipnozoítas nas vísceras de animais inoculados com estas preparações foi sempre superior em relação àquelas obtidas por digestão triptica.

Possivelmente, as questões relativas à capacidade de infecção entre hospedeiros intermediários, através do carnivorismo, possam ser melhor esclarecidas no futuro, uma vez que há controvérsias sobre se este processo se dá até ao sétimo ou décimo dia após a infecção (BRÖSIGKE, 1981; LOSS, 1991).

A infectividade, assim como a provável sensibilidade a drogas coccidiostáticas ou coccidicidas, são fenômenos que podem ser alterados pela ação triptica sobre glicoproteínas de superfície parasitária, capazes de conferir características biológicas ainda a serem esclarecidas.

SHARMA & DUBEY (1981) encontraram dados semelhantes para cistos de *T. gondii* obtidos através de digestão péptica ou triptica.

Desta forma, conclui-se que a digestão péptica deve ser o método de escolha na obtenção, quantificação e estudos de biologia de formas intra-tecduais de coccídias.

## SUMMARY

In this paper, a study of the enzymatic digestion was carried out in order to determine its influence on the viability, infectivity and quantity of hipnozoites recovered from albino mice experimentally infected with *Cystoisospora felis*. Trypsin and pepsin digestions of viscera containing the parasite were compared. Hipnozoites of *C. felis* survived in pepsin, as well as in trypsin solutions, for at least 2 hours. Viability, integrity, and infectivity were better maintained when pepsin was used to digest organs containing the parasite.

KEY WORDS: *Cystoisospora felis*, hipnozoites, enzymatic digestion, trypsin, pepsin.

## REFERÊNCIAS

- BRÖSIGKE, S. (1981). *Untersuchungen an extraintestinalen entwicklungsstadien (Dormozoitien) von Cystoisospora rivolta der Katzen in der Maus*. Dissertation zur Erlangung der Tiermedizinischen Doktor wurde der Tierarstlichen, Muchen, 37 p.
- BRÖSIGKE, S., HEINE, J. & BOCH, J. (1982). Der Nachwels estraintestinalen entwicklungsstadien (Dormozoitien) in experimentell mit *Cystoisospora rivolta* oozysten infizierten Mausem. *Klentier Praxis*, 27:25-34.
- FAYER, R. (1980). Epidemiology of protozoan infection: The coccidia. *Vet. Parasitol.*, 6:75-103.
- FAYER, R. & FRENKEL, J.K. (1979). Comparative infectivity for calves of oocysts of feline coccidia. *Besnoitia, Hammondia, Cystoisospora, Sarcocystis and Toxoplasma*. *J. Parasitol.*, 65:756-762.
- GEYSEN, J., AUSMA, J. & VANDEN-BOSSCHE, H. (1991). Simultaneous purification of merozoites and schizonts of *Eimeria tenella* (Apicomplexa) by percoil flotation and assessment of cell viability with a double fluorescent dye assay. *J. Parasitol.*, 77:987-993.
- JACOBS, L., REMINGTON, J.S. & MELTON, M.L. (1960). A survey of meat samples from swine, cattle and sheep for the presence of encysted *Toxoplasma*. *J. Parasitol.*, 46:23-28.
- JACUBKE, H.D. & JESCHKEIT, H. (1981). *Brockhaus ABC Biochemie*. Editora Berlin, Berlin, 520 p.
- LOSS, Z.G. (1991). *Cistoisosporose Felina*. Tese de Doutorado. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 104 p.
- SHARMA, S.P. & DUBEY, J.P. (1981). Quantitative survival of *Toxoplasma gondii* tachyzoites and bradyzoites in pepsin and tripsin solutions. *Am. J. Vet. Res.*, 42:128-130.
- SPEER, C.A. (1983). The Coccidia. In: Jensen, J.B. (Ed.). *In vitro Cultivation of Parasites*. CRC Press Inc., Florida, p. 1-64.

(Received 27 December 1993, Accepted 17 August 1995)