

DISTRIBUIÇÃO DE HIPNOZOÍTAS DE *CYSTOISOSPORA FELIS* (WENYON, 1923) FRENKEL, 1977 (APICOMPLEXA: SARCOCYSTIDAE) EM CAMUNDONGOS ALBINOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS.

R. B. FREIRE¹ & C. W. G. LOPES²

(1) Laboratório de Imunologia - Sanidade Animal (EMBRAPA/UFRRJ), Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, Instituto de Veterinária; (2) Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 23.851-970 Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil.

SUMÁRIO: Neste trabalho, verificou-se a distribuição relativa de formas hipnozoítas de *Cystoisospora felis*, em vísceras de camundongos albinos experimentalmente infectados. Para tanto, 1000 camundongos foram inoculados por via oral com 106 oocistos, obtidos a partir de fezes de felinos. Ao longo de 30 dias após infecção(DAI), grupos de 10 animais foram sacrificados e eviscerados. Os hipnozoítas foram recuperados através da digestão péptica de vísceras, e avaliados quanto à viabilidade, dimensões e quantidade relativas ao tempo de infecção. Os zoítas, com dimensões que variaram entre 5,75 X 14,52mm (até o 7ºDAI) e 12,35 X 35,80 mm (a partir do 21ºDAI), foram recuperados com viabilidade de $99 \pm 1\%$. A quantificação proporcional de hipnozoítas sugeriu serem linfonodos mesentéricos (LM), baço (B) e fígado (F), os principais alvos de colonização para estes protozoários. A proporção de hipnozoítas recuperados a partir de LM foi de 91,5% dos zoítas extraintestinais obtidos por animal, durante o 8º DAI. A partir de então, houve um decréscimo progressivo no número de zoítas que, passaram a distribuir-se de maneira homogênea até o 30ºDAI. Embora B tenha originado entre 20 e 40% do total de hipnozoítas quantificados durante todo o experimento, F apresentou quantidades proporcionalmente variáveis do parasita. Nesta víscera, ocorreu um aumento crescente de até o 21ºDAI, quando registrou-se 40% do total de zoítas quantificados. A partir de então, não ocorreu alteração numérica significativa. Discutiu-se, ainda, sobre características exclusivas da distribuição e tropismo de *Cystoisospora felis*, comparativamente a dados da literatura previamente determinados para *Cystoisospora rivolta*.

PALAVRAS CHAVE: *Cystoisospora felis*, hipnozoítas, distribuição de zoítas, digestão péptica de vísceras parasitadas.

INTRODUÇÃO

Cystoisospora felis, pertencente à família Sarcocystidae, subfamília Cystoisosporinae, é capaz de infectar hospedeiros variados, podendo determinar prejuízos importantes à saúde animal (LOSS, 1991; FREIRE, 1993; FREIRE & LOPES, 1995). Estes protozoários, ao infectarem hospedeiros intermediários, apresentam ciclo biológico alternativo, no qual formam-se cistos monozóicos extra-intestinais, denominados de hipnozoítas (DUBEY, 1979).

Embora as características morfológicas destes parasitas tenham sido amplamente estudadas (DUBEY & FRENKEL, 1972; FRENKEL & DUBEY, 1972; DUBEY,

1979), praticamente nada se conhece em relação à sua distribuição no organismo de hospedeiros infectados.

A quantificação relativa de formas císticas monozóicas, obtidas a partir de infecções experimentais com *Cystoisospora rivolta* em camundongos albinos, serviu para demonstrar que esta espécie apresenta acentuado tropismo para linfonodos mesentéricos (LM) e fígado (F) (BROSIGKE *et alii*, 1982). Por outro lado, questões inerentes à distribuição pelas vias sangüínea e linfática, ainda não foram esclarecidas. Possivelmente a via sangüínea esteja relacionada com o espalhamento de zoítas através de sistemas de recirculação, tais como o ducto torácico. A circulação linfática de zoítas pode estar relacionada à contaminação de neonatos,

especialmente de felinos, durante a amamentação (LOSS, 1991). Este trabalho foi realizado com o objetivo de se determinar, pela primeira vez, o modo pelo qual as formas císticas extra-intestinais de *C. felis* distribuem-se, à partir de infecções experimentais de camundongos albinos, com oocistos esporulados.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais: Foram utilizados 1000 camundongos suíço-albinos, machos com 14 dias de idade, pesando 15 ± 1 gramas, procedentes do laboratório de Imunologia - DMIV, IV, Projeto Sanidade Animal (UFRRJ/EMBRAPA).

Obtenção de oocistos e infecção experimental: Oocistos de *C. felis* foram purificados de acordo com metodologia previamente descrita (BROSIGKE *et alii*, 1982; LOSS, 1991; FREIRE, 1993). De maneira sucinta, oocistos, eliminados nas fezes de gatos recém-desmamados, foram concentrados através de flutuação em solução saturada de sacarose, através de centrifugação a 600 X g durante 15 minutos à temperatura ambiente. Oocistos piriformes, característicos de *C. felis*, foram quantificados em câmara hemocitométrica, ao microscópio ótico com um aumento de 400 X. Em seguida, procedeu-se a infecção com 106 oocistos/animal., através de canulação oral.

Sacrifícios: Os animais foram sacrificados através de deslocamento cervical, em lotes de 10 camundongos por dia de sacrifício, nos dias 0, 3, 6, 7, 8, 9, 16, 21, 28 e 30, após infecção (DAI).

Recuperação de hipnozoítas: Os hipnozoítas foram recuperados a partir da digestão péptica de fígado (F), baço (B), rins (R), pulmões (P), linfonodos mesentéricos (LM) e placas de Peyer (PP). As vísceras foram cuidadosamente cortadas em pequenos fragmentos e acondicionadas em Erlenmeyers estéreis, previamente resfriados em banho de gelo. Sobre os fragmentos adicionou-se solução enzimática contendo 5,2 mg/ml de pepsina (SIGMA, St. Louis, USA) com atividade de ensaio de 1:10.000, 10 mg/ml de NaCl e 1,4% de HCl 1 N. Após estabilização térmica, os homogeneizados resultantes foram incubados a 37 °C durante 30 minutos. A reação foi, então, interrompida pela adição de solução salina tamponada com fosfatos (PBS) (8,00g/l de NaCl, 0.20 g / l de KCl, 1.15 g / l de Na_2HPO_4 e 0.20g/l de NaH_2PO_4 , pH 7.2) a 4 °C, seguida de três centrifugações sequenciais a 600 X g/4 °C /20 minutos. Os hipnozoítas foram recuperados pela filtração dos materiais digeridos através de gaze dupla, seguida de passagem através de seringa de 5 ml contendo lã de "nylon" (SANTISTA, SP, Brasil). Os eluatos foram concentrados por centrifugação e ressuspensos em 0,5 - 1,0 ml de PBS.

Quantificação de hipnozoítas: Aliquotas de 10 ml de suspensão de hipnozoítas foram colocados entre lâmina e lamínula e observados em microscópio de contraste de fase (JENAVAL, Alemanha). O número de hipnozoítas foi obtido foi determinado pela fórmula:

$$H = n \cdot 100 \cdot v$$

Onde n é o número de zoítas contidos na alíquota de 10 ml, 100 é a correção para 1 ml e v o volume total da amostra do órgão digerido.

Morfometria: A morfometria foi realizada com auxílio de ocular micrométrica SK 15X (PZO, Alemanha), em microscópio binocular (Carl Zeiss, Alemanha). Foram realizadas medidas equatoriais e polares de todas as amostras obtidas. Para facilitar as mensurações, os hipnozoítas foram fixados em solução contendo formol a 10% adicionada de Glutaraldeído (SIGMA, St. Louis, USA) a 25%. Através deste procedimento, impediu-se a movimentação e manteve-se a forma original dos hipnozoítas de *C. felis*.

Ensaio de viabilidade: A determinação da viabilidade das preparações foi realizada de acordo com a metodologia descrita por GEYSEN *et alii* (1991), para *Eimeria tenella*, com ligeiras modificações.

Misturou-se igual volume de solução de laranja de acridina (RIEDEL, UK) a 0,1% e suspensão parasitária. Após cinco minutos de incubação à temperatura ambiente, os zoítas viáveis apresentaram uma fluorescência amarelo-esverdeada, facilmente visualizada ao microscópio de epi-fluorescência (ZEISS, Alemanha). O percentual de parasitas vivos foi calculado através de quantificação visual, em uma série de 50 campos óticos, representando, no mínimo, 200 avaliações.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Embora a potencialidade infecciosa de *Cystoisospora felis* seja reconhecida por diferentes autores (BROSIGKE *et alii*, 1982; LOSS, 1991; FREIRE, & LOPES, 1995), a exemplo do que ocorre com outros membros da família Sarcocystidae, pouco se conhece sobre as síndromes espoliativas geradas em seus hospedeiros intermediários (LOSS, 1991; FREIRE, 1993). Neste trabalho, 1.000 camundongos albinos foram infectados oralmente com 106 oocistos esporulados de *C. felis*, com a finalidade de se caracterizar e quantificar cistos monozóicos extra-intestinais, através da digestão péptica de vísceras (LM, B, F, PP, R, C e P) de animais experimentalmente infectados. As formas hipnozoítas foram recuperadas a partir de grupos de 10 indivíduos sacrificados aos 0, 3, 6, 7, 8, 9, 16, 21, 28 e 30 DAI, respectivamente. Morfológicamente, os hipnozoítas apresentaram-se caracteristicamente elipsóides, em forma de banana (Fig. 1). As mensurações realizadas nos 7, 9, 16 e 21 DAI originaram um valor médio equivalente a

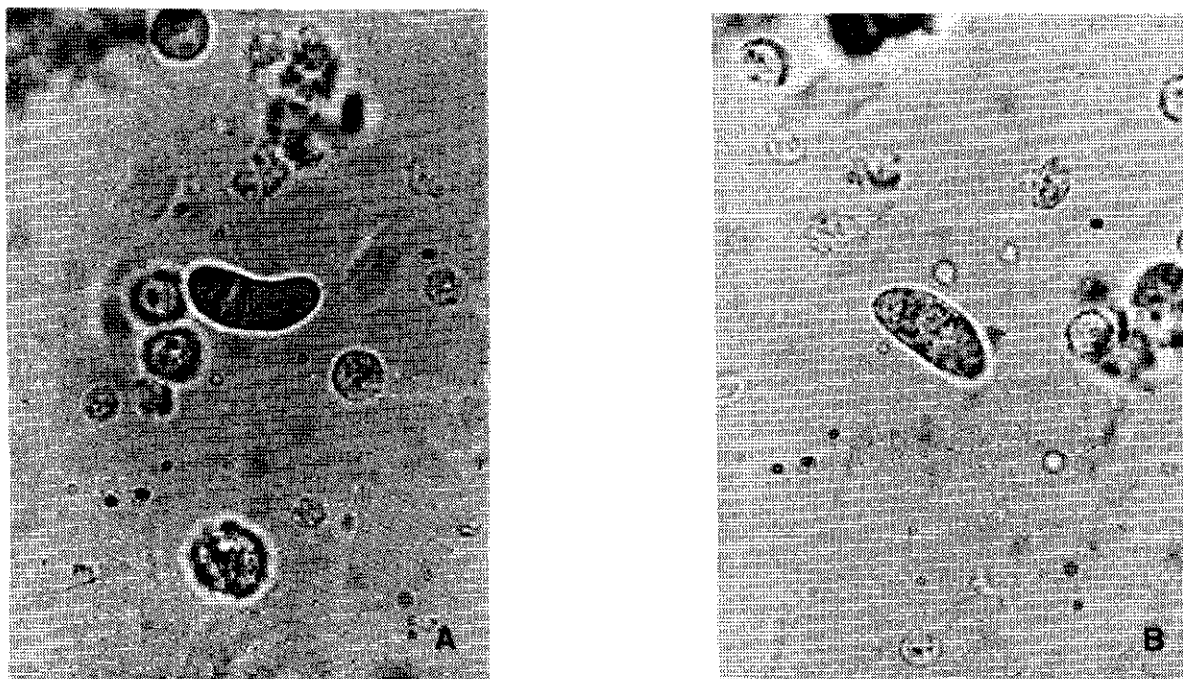


Fig. 1. Hipnozoítas de *Cystoisospora felis*. Formas longa (A) e larga (B). 1250X.

$24,03 \pm 2,4 \times 9,09 \pm 1,5$ mm, com índice morfométrico de 2,64.

As medidas realizadas ao longo do período de infecção, evidenciaram um aumento de tamanho proporcional ao tempo de infecção (Tabela 1). Aos 7 DAI, a média das medidas foi entre $12,62 \times 4,52$ mm e $16,42 \times 6,98$ mm, enquanto que, aos 21 DAI a média das mensurações oscilou entre $32,81 \times 10,59$ mm e $38,79 \times 14,11$ mm.

As medidas realizadas por BRÖSIGKE *et alii* (1982), em experimento semelhante realizado com hipnozoítas de *C. rivolta*, obtidos por digestão triptica de LM de camundongos albinos experimentalmente infectados, evidenciou estruturas parasitárias desprovidas de vacúolos parasitóforo, com medidas entre $15,5 - 17,4 \times 3,0 - 4,6$ mm aos 7 DAI. Os hipnozoítas possuidores de envoltórios caracterizaram-se por apresentarem dimensões entre $21,7 - 25 \times 9,3 - 10$ mm. Ao final de 28 DAI, os hipnozoítas de *C. rivolta* apresentaram dimensões entre $24,8 \times 11,6$ mm e $28,0 \times 12,4$ mm. Embora as dimensões finais observadas por BRÖSIGKE *et alii* (1982), assemelhem-se à média total das medidas realizadas no presente estudo, os índices morfométricos obtidos são bastante distintos. O índice morfométrico estimado para *C. rivolta* foi de 1,46, enquanto que, no presente trabalho, estimou-se um índice 1,78 vezes maior (2,64) para *C. felis*.

A recuperação de zoítas vivos quantificada pela absorção da laranja de acridina, com emissão de luz verde amarelada sob radiação ultra violeta, mostrou viabilidade entre 98 e 100 %, para os organismos recuperados a partir da digestão péptica das vísceras. Este fato demonstra que o processo de digestão

Tabela 1 - Medidas de hipnozoítas de *C. felis* em linfonodos mesentéricos de camundongos albinos, submetidos à digestão péptica, após diferentes intervalos a partir de infecção experimental com 10^6 oocistos por via oral. Medidas em μ m.

Dias pós-infecção	Diâmetro (μ m)		Índice morfométrico	Número de formas medidas
	Maior	Menor		
7	$14,51 \pm 1,90$	$5,75 \pm 1,23$	2,53	50
9	$18,15 \pm 2,15$	$6,79 \pm 1,30$	2,67	50
16	$27,02 \pm 2,60$	$11,26 \pm 1,70$	2,40	52
21	$35,80 \pm 2,99$	$12,35 \pm 1,76$	2,90	52

utilizado praticamente não interferiu nas características biológicas vitais das formas parasitárias obtidas. O número de zoítas recuperados mostrou-se crescente até 6 DAI, quando foram obtidos, em média, $3,4 \times 10^4$ hipnozoítas. A partir de então, houve um decréscimo, seguido de aumento aos 9 DAI, onde detectou-se $3,06 \times 10^4$ hipnozoítas e nova queda aos 30 DAI, quando foram quantificados $1,9 \times 10^4$ hipnozoítas (Tabela 2). BRÖSIGKE *et alii* (1982), ao estudarem a distribuição de hipnozoítas de *C. rivolta*, em camundongos albinos, consideraram que $2,9 \times 10^4$ hipnozoítas, detectados aos 28 DAI, seria a maior quantidade de cistos monozóicos extraintestinais detectada. Estes autores também verificaram um aumento na quantidade de hipnozoítas recuperados aos 7 e aos 28 DAI, caindo progressivamente até os 168 DAI, quando registraram $1,6 \times 10^4$ hipnozoítas. Embora as diferenças numéricas possam estar relacionadas à modalidade

Tabela 2 - Números médios de hipnozoítas quantificados em vísceras de camundongos albinos inoculados com 10^6 oocistos esporulados de *Cystoisospora felis*

Dias após infecção	Número de hipnozoítas/viscera ^a					Total
	Baço	Fígado	Linf. mes.	P. Peyer	Outros	
0	0	0	0	0	0	0
3	2000(16,00) ^b	1000(8,00)	2000(16,00)	5000(40,00)	2500(20,00)	12500(100,00)
6	9600(28,00)	4800(14,00)	8800(26,00)	8800(26,00)	2000(6,00)	34000(100,00)
7	9641(40,60)	3214(13,50)	10147(42,70)	618(2,60)	150(0,60)	23770(100,00)
8	6160(2,60)	2400(5,20)	20000(91,50)	460(0,40)	132(0,30)	29092(100,00)
9	800(21,20)	1600(8,20)	28000(68,70)	120(1,40)	95(0,50)	30614(100,00)
16	6000(21,70)	6500(21,70)	15500(51,80)	500(1,80)	899(3,00)	29899(100,00)
21	4250(16,90)	11000(43,70)	9450(37,60)	400(1,60)	50(0,20)	25150(100,00)
28	5000(26,30)	9200(48,40)	4500(23,60)	300(1,60)	20(0,10)	19020(100,00)
30	5100(26,80)	8020(42,20)	5741(30,20)	129(0,70)	10(0,10)	19000(100,00)

a Os resultados são a média dos valores obtidos de cinco animais para cada dia de experimento.

b Números entre parênteses representam o percentual de hipnozoítas em cada dia de avaliação.

de digestão enzimática empregada, a quantificação global de hipnozoítas de *C. felis* sugere um ciclo biológico mais acelerado do que aquele empreendido por *C. rivolta*. O maior número de hipnozoítas de *C. felis* foram recuperados em, aproximadamente 10 dias, enquanto que para *C. rivolta*, proporções semelhantes foram descritas somente aos 28 DAI.

A distribuição global de hipnozoítas nas diferentes vísceras avaliadas, sugeriu um tropismo mais elevado pelo F, LM e B (Tabela 2). Aos 3 DAI, a maior quantidade de hipnozoítas foi detectada em PP (40% do total de zoítas observados). Esta proporção decresceu progressivamente até o final do experimento (30 DAI), quando detectou-se somente 0,7% dos zoítas recuperados. LM foi a víscera de eleição entre 8 e 16 DAI, quando obteve-se 91,5% e 51,8% dos hipnozoítas recuperados, respectivamente. A partir de então, a quantidade de zoítas decresceu até os 30 DAI, quando recuperou-se 30,2% hipnozoítas. Embora B tenha originado entre 20 e 40% do total de hipnozoítas quantificados durante todo o experimento, F apresentou quantidades proporcionalmente variáveis do parasita. Esta víscera mostrou-se intensamente parasitada a partir de 21 DAI, quando passou a representar a víscera de eleição, com uma recuperação de zoítas equivalente a 43,7% aos 21 DAI, 48,4% aos 28 DAI e 42,2% aos 30 DAI, respectivamente. A partir de 21 DAI, F, B e LM apresentaram a maior concentração de hipnozoítas recuperados, o que reforça a possibilidade de uma via sanguínea, além da via linfática, de disseminação do parasita. BRÖSIGKE *et alii* (1982), observaram que os hipnozoítas de *C. rivolta* apresentava tropismo por LM nos 2, 4, 14, 84 e 168 DAI. Além disto, observaram que F manteve-se como

víscera de eleição somente aos 3 e 7 DAI. Com base nos resultados obtidos, pode-se deduzir que, embora tanto *C. rivolta* como *C. felis* distribuam-se pelas vias sanguínea e linfática, não o fazem nas mesmas proporções. O tropismo e distribuição relativos à *C. felis* parecem estar mais intensamente relacionados à via sanguínea no organismo de hospedeiros intermediários.

SUMMARY

This paper describes a study on the relative distribution of *Cystoisospora felis* hypnozoites in albino mice experimentally infected with this protozoan. One thousand mice were infected by oral route with 10^6 oocysts recovered from cat faces. Thirty days after infection, groups of ten mice were sacrificed and the viscera were digested in pepsin. The hypnozoites were recovered from peptic digestion and evaluated regarding their viability, size and quantity related to the time of infection. Zoites of $5,75 \times 14,52\mu\text{m}$, up to the 7th day after infection (DAI), and $12,35 \times 35,80\mu\text{m}$, from the 21st DAI onwards, were recovered with a viability of $99 \pm 1\%$. The proportionate amount of hypnozoites suggests that mesenteric lymph nodes (MLN), spleen and liver are the main sites of parasite colonization. The proportion of hypnozoites recovered from MLN was 91.5% from the total extraintestinal parasites recovered per animal on the 8th DAI. After that, there was a progressive decrease on the number of zoites that were evenly

distributed up to the 30th DAI. Although the spleen generate 20-40% from the total of hipnozoites throughout the experiment, the liver showed variable amounts of parasites. In this organ there was a growing increase of zoites up to the 21st DAI, meaning 40% of the total. After it, were no significant numerical changes. The exclusive characteristics of distribution and tropism of *Cystoisospora felis* were discussed in comparison with those mentioned in the literature to *Cystoisospora rivolta*.

KEY WORDS: *Cystoisospora felis*, hipnozoites, peptic digestion of infected viscera, albino mice.

REFERÊNCIAS

- BRÖSIGKE, S.; HEINE, J. & BOCH, J. (1982) Der Nachweis extraintestinalen Entwicklungsstadien (Dormozoiten) in experimentell mit *Cystoisospora rivolta* oozysten infizierten Mäuse. *Klontier Praxis*, 27: 25-34.
- DUBEY, J.P. (1979) Life cycle of *Isospora rivolta* (Grassi, 1879) in cats and mice. *J. Protozool.*, 26: 433-443.
- DUBEY, J.P. & FRENKEL, J.K. (1972) Extraintestinal stages of *Isospora felis* and *Isospora rivolta* (Protozoa: Eimeriidae) in cats. *J. Protozool.*, 19: 89-92.
- FREIRE, R.B. (1993) *Cystoisospora felis* (Wenyon, 1926) Frenkel, 1977 (Apicomplexa: Sarcocystidae): caracterização, infecção experimental e resposta imune em camundongos albinos. *Tese de Doutorado em Parasitologia Veterinária*, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 110p.
- FREIRE, R.B. & LOPES, C.W.G. (1995) Infecção experimental em camundongos neonatos com esporozoítas de *Cystoisospora felis* (Wenyon, 1923) Frenkel, 1977 (Apicomplexa: cystoisosporinae). *R. Bras. Ci. Vet.* 2 (1): 33-34.
- FRENKEL, J.K. & DUBEY, J.P. (1972) Rodents as vectors for feline coccidia, *Isospora felis* and *Isospora rivolta*. *J. Infect. Dis.*, 125: 69-72.
- GEYSEN, J. AUSMA, J. & VANDER-BOSSCHE (1991) H. Simultaneous purification of merozoites and schizonts of *Eimeria tenella* (Apicomplexa) by percoll flotation and assessment of cell viability with double fluorescent dye assay. *J. Parasitol.*, 77: 989-993.
- LOSS, Z.G. Cistoisoporose felina. *Tese de Doutorado em Parasitologia Veterinária*, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 104 p. , 1991.

(Received 27 December 1993, Accepted 07 June 1994, Received 06 March 1996)