

**CARACTERIZAÇÕES MORFOLÓGICA, MORFOMÉTRICA E
ULTRAESTRUTURAL DE FORMAS INTRAERITROCÍTICAS DE**
Cytauxzoon felis simile

ALESSANDRA SCOFIELD AMARAL

2002



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

**CARACTERIZAÇÕES MORFOLÓGICA, MORFOMÉTRICA E
ULTRAESTRUTURAL DE FORMAS INTRAERITROCÍTICAS DE
*Cytauxzoon felis simile***

ALESSANDRA SCOFIELD AMARAL

Sob a Orientação do Professor
Dr. Aivaldo Henrique da Fonseca

Co-orientação dos Professores
Dr. Paulo Vargas Peixoto
Dr. Carlos Luiz Massard

Tese submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de **Magister
Scientiae** em Ciências Veterinárias, Área
de concentração em Parasitologia
Veterinária.

**Seropédica, RJ
Outubro de 2002**

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

ALESSANDRA SCOFIELD AMARAL

Tese submetida ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, como requisito parcial para obtenção do grau de Magister Scientiae, em Ciências Veterinárias, área de concentração em Parasitologia Veterinária.

TESE APROVADA EM/...../.....

Adivaldo Henrique da Fonseca. Dr. UFRRJ
(Orientador)

Marilene de Farias Brito Queiroz. Dra. UFRRJ

Paulo Vargas Peixoto. Dr. UFRRJ

*A Deus pelo auxílio, força, proteção e por
sempre me mostrar novos caminhos a serem trilhados.*

*À minha Mãe Janeth e Irmãs Vivianne
e Caroline pelo amor, carinho, apoio e
por compreenderem a minha ausência
física em busca dos meus sonhos.
Amo vocês.*

*A todos os meus Amigos pelo carinho, apoio,
conselhos e verdadeira amizade. Vocês são muito
importantes para mim. Obrigada por tudo!*

*Dedico este trabalho ao meu amigo Cleber Oliveira Soares.
Agradeço- lhe pela amizade, ensinamentos, confiança,
paciência, críticas construtivas e apoio
durante toda a minha caminhada.*

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. Adivaldo Henrique da Fonseca pela amizade, orientação, apoio e possibilidade de realizar este trabalho.

À equipe do Laboratório de Doenças Parasitárias - Projeto Sanidade Animal/ Embrapa: Renata Cunha Madureira, Carlo José Freire de Oliveira, Isis Abel Bezerra, Abisair Andrade de Castro, Cátia Marques da Costa, Jaime da Silva Pena, Nathalie Costa da Cunha, Luiz Carlos Ribeiro da Paz, Daniel da Silva Guedes Júnior, Luciana Rodrigues de Almeida, Fábio Jorge Moreira da Silva e Fabíola do Nascimento Corrêa, pela amizade, apoio e por compartilharem de muitos momentos na realização deste trabalho. Vocês são muito especiais!

Ao prof. Dr. Carlos Luiz Massard pelos valiosos ensinamentos e amizade.

Ao prof. Dr. Paulo Vargas Peixoto pelos conselhos, apoio, incentivo e amizade.

Ao prof. Dr. Carlos Hubinger Tokarnia e à profa. Dra. Marilene de Farias Brito Queiroz pela amizade e grandiosa ajuda no processamento das imagens.

Ao estagiário Carlo José Freire de Oliveira pela dedicação e importante auxílio durante a fase experimental.

Aos animais que tanto contribuíram para a realização deste estudo.

À mestrandia Franziska Hüber e à prof. Dra. Teresa Cristina Bergamo do Bomfim pela disponibilidade do laboratório.

Ao Alessandro Antônio da Silva pelo carinho, paciência e estímulo.

À profa. Regina Ramadilha, ao prof. João Telhado e aos veterinários Carla Andresa, Paulo, Cristiano e Fábio pela colaboração.

Ao doutorando Evander Batista e ao Dr. Wanderley de Souza, do Laboratório de Ultraestrutura Celular “Hertha Meyer” do Departamento de Biofísica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, pelo importante auxílio nos trabalhos de microscopia eletrônica de transmissão.

À Embrapa Agrobiologia – Seropédica/RJ, em especial aos técnicos Geraldo Cruz Baeta, Wilson Cabral da Fonseca e Waldir José Timóteo, pelo apoio na realização deste trabalho.

À Embrapa Gado de Corte – Campo Grande/ MS, em especial ao técnico Luis Leal pela ajuda no processamento das fotografias.

Aos professores, funcionários e colegas do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária - Área de concentração Parasitologia Veterinária, o meu muito obrigada.

A todos que auxiliaram de maneira direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

A Capes e Faperj pelo apoio e auxílio financeiro.

BIOGRAFIA

Alessandra Scofield Amaral, filha de Aroldo Amaral Costa e Geralda Janeth Scofield Amaral, nasceu em 16 de abril de 1975, na cidade de Itambacuri, Estado de Minas Gerais (MG), onde cursou o ensino fundamental na Escola Estadual Madre Serafina de Jesus. Realizou o ensino médio na Cidade de Governador Valadares, MG, no Colégio Ibituruna, no período de 1990 a 1993.

No ano de 1995, ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), colando grau e obtendo o título de Médica Veterinária em 25 de novembro de 2000.

Foi bolsista de Iniciação Científica pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), no período de fevereiro de 1997 a novembro de 2000, junto a projetos de pesquisa na área de hemoparasitologia. Foi bolsista de Aperfeiçoamento Científico do CNPq de dezembro de 2000 a fevereiro de 2001, na mesma linha de pesquisa.

Durante o período acadêmico participou de projetos de pesquisa no Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública e, no Departamento de Parasitologia Animal da UFRRJ. Colaborou no desenvolvimento de projetos de pesquisa em conjunto com a Universidade de São Paulo, Universidade Federal Fluminense, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e a Embrapa Gado de Corte. Participou de 35 publicações científicas, entre artigos em revistas científicas indexadas e em congressos e eventos científicos nacionais e internacionais.

Em 05 de março de 2001 ingressou no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – Área de Concentração Parasitologia Veterinária (CPGCV-PV), em nível de Mestrado, da UFRRJ, onde foi Bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) entre março de 2001 e fevereiro de 2002. Foi contemplada, entre seus pares, como Bolsista de mestrado do Programa “Bolsa Nota 10” da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) entre março de 2002 até o presente momento. E nesta data, apresenta e defende esta dissertação como requisito parcial para a obtenção do título de *Magister Scientiae*.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Breve histórico e aspectos gerais sobre a citauxzoonose.....	3
2.2 Gênero <i>Cytauxzoon</i>	4
2.2.1 Citauxzoonose felina.....	4
2.3 <i>Cytauxzoon felis</i>	6
2.3.1 Filogenia e evolução.....	7
2.3.2 Posição sistemática e <i>status</i> taxonômico.....	9
2.3.3 Biologia, morfologia e ultraestrutura.....	11
2.3.3.1 Formas intrahistiocíticas.....	11
2.3.3.2 Formas intraeritrocíticas.....	12
2.3.3.3 Gametogonia e esporogonia.....	13
2.3.4 Vetores.....	14
2.3.5 Hospedeiros.....	15
2.3.6 Diagnóstico.....	19
2.3.6.1 Diagnóstico direto.....	19
2.3.6.2 Diagnóstico indireto e exames auxiliares.....	20
2.3.6.3 Diagnóstico diferencial.....	21
2.3.7 Tratamento.....	24
2.3.8 Distribuição.....	25
2.3.9 Potencial zoonótico.....	26
3. CAPÍTULO I. Caracterizações morfológica e morfométrica de formas intraeritrocíticas de <i>Cytauxzoon felis simile</i>	27

Resumo.....	28
Abstract.....	29
3.1 Introdução.....	30
3.2 Material e Métodos.....	32
3.2.1 Origem dos isolados de <i>Cytauxzoon felis simile</i>	32
3.2.2 Multiplicação dos isolados.....	32
3.2.3 Acompanhamento experimental.....	32
3.2.4 Coleta e processamento do material.....	33
3.2.5 Análises microscópicas morfológica e morfométrica.....	33
3.2.6 Fotomicrografias.....	33
3.2.7 Análises estatística e gráfica.....	34
3.3 Resultados.....	35
3.3.1 Caracterizações morfológica e morfométrica.....	35
3.3.2 Análises estatística e gráfica.....	43
3.4 Discussão.....	50
4. CAPÍTULO II. Ultraestrutura de formas intraeritrocíticas de <i>Cytauxzoon felis simile</i>	52
Resumo.....	53
Abstract.....	54
4.1 Introdução.....	55
4.2 Material e Métodos.....	56
4.2.1 Origem e multiplicação de <i>Cytauxzoon felis simile</i>	56
4.2.2 Acompanhamento experimental.....	56
4.2.3 Procedimento para microscopia eletrônica de transmissão.....	57
4.2.4 Fotomicrografias.....	58
4.3 Resultados.....	59
4.4 Discussão.....	62
5. CONCLUSÕES.....	66
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS

Páginas

1. Principais formas eritrocíticas de Piroplasmida e Rickettsia parasitas de felinos. A , <i>Babesia herpailuri</i> ; B , <i>Babesia pantherae</i> ; C , <i>Babesia cati</i> ; D , <i>Babesia felis</i> ; E , <i>Haemobartonella felis</i> ; F , <i>Cytauxzoon felis</i> (SOARES, 2002).....	24
2. Esquema dos principais tipos morfológicos e localizações intraeritrocíticas de <i>Cytauxzoon felis simile</i> . A , Forma puntiforme; B , Forma em anel de rubi; C , Forma ovóide; D , Forma piriforme; E , Forma alongada; F , Forma tétrede.....	36
3. <i>Cytauxzoon felis simile</i> . A , B , C , Eritrócitos parasitados (→) por formas puntiformes apresentando cromatina nuclear em forma de ponto e citoplasma claro, porém bem delimitado. A , Presença de plaquetas (p). Corados pelo método Giemsa (1.000x).....	37
4. <i>Cytauxzoon felis simile</i> . A , Eritrócito parasitado (→) por uma forma piriforme com uma extremidade afilada e a outra romba onde localiza-se o núcleo; presença de neutrófilo (n) e plaqueta (p). B , Forma piriforme presente na figura A com maior aproximação (→). C , Forma piriforme parasitando eritrócito (→). Corados pelo método Giemsa (1.000x).....	38
5. <i>Cytauxzoon felis simile</i> . A , Eritrócito parasitado (→) por forma em anel de rubi com cromatina nuclear arredondada, bem proeminente em um dos pólos do parasito e citoplasma anelar bem evidente; presença de um neutrófilo jovem (nj) e um neutrófilo maduro (n). B , C , Formas em anel de rubi infectando eritrócitos em maior aproximação (→). Corados pelo método Giemsa (1.000x).....	39
6. <i>Cytauxzoon felis simile</i> . A , Eritrócitos parasitados (→) por formas ovóides com cromatina nuclear condensada em formato de meia lua e citoplasma claro bem definido; presença de eosinófilos (e), neutrófilo (n) e leucócito em degeneração (L). B , C , Formas ovóides, em maior aproximação, infectando eritrócitos (→). Corados pelo método Giemsa (1.000x).....	40
7. <i>Cytauxzoon felis simile</i> . A , Eritrócito infectado (→) por uma forma alongada com núcleo hiper Cromático e citoplasma extenso; presença de leucócito em degeneração (L). B , Forma alongada parasitando eritrócito (→) localizado abaixo de um eosinófilo (e). C , Eritrócito infectado (→) por uma forma alongada. Corados pelo método Giemsa (1.000x).....	41

8. <i>Cytauxzoon felis simile</i> . A , Formas em tétrede semelhantes à Cruz-de-Malta (→) e presença de outros tipos morfológicos infectando eritrócitos. B , Eritrócito parasitado por uma forma em tétrede, resultante de divisão binária; observam-se quatro trofozoítas semelhantes a pequenas formas piriformes com cromatina nuclear diminuta localizada em uma das extremidades (→) . C , Forma em tétrede desarmada com quatro trofozoítas localizados na região mediana do eritrócito (→). Corados pelo método Giemsa (1.000x).....	42
9. Distribuição percentual dos tipos morfológicos eritrocíticos de <i>Cytauxzoon felis simile</i> em gatos domésticos infectados experimentalmente com isolado de onça-pintada (<i>Panthera onca</i>) Análise da média geral da dinâmica de infecção de três gatos positivos durante o período experimental, em diferentes fases.....	45
10. Distribuição percentual dos tipos morfológicos eritrocíticos de <i>Cytauxzoon felis simile</i> em gatos domésticos infectados experimentalmente com isolado de gato-do-mato pequeno (<i>Leopardus tigrinus</i>). Análise da média geral da dinâmica de infecção de três gatos positivos durante o período experimental, em diferentes fases.....	47
11. Ultraestrutura de trofozoítos eritrocíticos de <i>C. felis simile</i> . A , Trofozoíto no interior de eritrócito (ER) com dupla membrana delgada (→); núcleo único excêntrico (N), ocupando completamente um dos pólos do parasito; mitocôndria atípica, sem cristas, com dupla membrana (M); vacúolos digestivos limitados por dupla membrana, contendo em seu interior estroma de eritrócitos; presença de citóstoma com dupla membrana; microtúbulos extranucleares (m), ribossomos (r), retículo endoplasmático (RE) e lisossomos (L) dispersos por todo o citoplasma (MET, 85.000x). B , C , Trofozoíto com membrana citoplasmática dupla, vacúolos digestivos eletrodensos contendo restos eritrocíticos; microtúbulos extranucleares e ribossomos dispersos pelo citoplasma (MET, 50.000x). D , Trofozoíto em corte transversal apresentando mitocôndria atípica (M) e vacúolos digestivos contendo restos eritrocíticos, ambos limitados por dupla membrana (MET, 85.000x). Não foi observado vacúolo prastóforo em nenhuma forma parasitária examinada.....	60
12 . Ultraestrutura de trofozoítos eritrocíticos de <i>C. felis simile</i> em divisão. A , Três trofozoítos com dupla membrana delgada limitante (→), único núcleo excêntrico (N), ocupando completamente um dos pólos de cada forma parasitária; organelas eletrodensas presentes em uma das formas em divisão (Or); e presença de pregas citoplasmáticas (↔) interligando as três formas durante o processo de divisão binária (MET 85.000x). B , Doze trofozoítos individualizados com dupla membrana delgada limitante (MET	

85.000x). C, Trofozoíto em forma de tétrade apresentando dupla membrana limitante (→) e organelas eletrodensas em um pólo de uma das formas (Or) (MET 20.000x). Não foi observado vacúolo parasitóforo em nenhuma forma parasitária examinada.....61

LISTA DE TABELAS

TABELAS	Páginas
1. Hospedeiros naturais e experimentais e distribuição geográfica da infecção causada por <i>Cytauxzoon felis</i> (SOARES, 2002).....	18
2. Diagnóstico diferencial de <i>Cytauxzoon felis</i> com outros piroplasmídeos em carnívoros e <i>Haemobartonella felis</i> (SOARES, 2002).....	23
3. Caracterizações morfológica e morfométrica de <i>Cytauxzoon felis simile</i> em gatos domésticos (n = 3) inoculados com isolado de <i>Panthera onca</i> naturalmente parasitado. Análise de diferentes tipos morfológicos intraeritrocítico em três coletas.....	46
4. Caracterizações morfológica e morfométrica de <i>Cytauxzoon felis simile</i> em gatos domésticos (n = 3) inoculados com isolado de <i>Leopardus tigrinus</i> naturalmente parasitado. Análise de diferentes tipos morfológicos intraeritrocítico em três coletas.....	48
5. Caracterização morfométrica de formas intraeritrocíticas de <i>Cytauxzoon felis simile</i> em gatos domésticos infectados com dois isolados. Análise da média geral, de cada coleta, por isolado.....	49

RESUMO

SCOFIELD, Alessandra. **Caracterizações morfológica, morfométrica e ultraestrutural de formas intraeritrocíticas de *Cytauxzoon felis simile***. Seropédica: UFRRJ, 2002. 76p. (Dissertação, Mestrado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Veterinária).

Aspectos morfológico, morfométrico e ultraestrutural foram descritos para trofozoítos intraeritrocíticos de dois isolados brasileiros de *Cytauxzoon felis simile*, um obtido a partir de onça-pintada (*Panthera onca*) e outro a partir de gato-do-mato pequeno (*Felis tigrina* = *Leopardus tigrinus*). Foram mensurados o diâmetro maior (DM), o diâmetro menor (dm) e o índice morfométrico (IM = dm/DM) de cada tipo de forma parasitária. Foram analisados o total de 1.605 trofozoítos. Os tipos morfológicos puntiforme ($1,80 \pm 0,24 \times 1,60 \pm 0,19 \mu\text{m}$), piriforme ($2,32 \pm 0,60 \times 1,73 \pm 0,32 \mu\text{m}$), anel de rubi ($2,21 \pm 0,34 \times 1,86 \pm 0,29 \mu\text{m}$), ovóide ($2,18 \pm 0,36 \times 1,94 \pm 0,35 \mu\text{m}$), alongada ($2,45 \pm 0,34 \times 1,76 \pm 0,29 \mu\text{m}$) e tetrade ($1,80 \pm 0,10 \times 1,56 \pm 0,09 \mu\text{m}$) foram observados. Houve o predomínio dos tipos morfológicos ovóide, alongado e anel-de-rubi, com pleomorfismo em ambos os isolados. Através de análise ultraestrutural de trofozoítos eritrocíticos dos gatos domésticos experimentalmente infectados com o isolado de onça-pintada, pôde-se observar presença de membrana citoplasmática dupla, delgada, núcleo excêntrico circundado por uma membrana dupla, mitocôndrias atípicas, não-pregueadas, com dupla membrana e localizada no pólo oposto ao núcleo e vacúolos digestivos também limitados por dupla membrana. Microtúbulos extranucleares, ribossomos, retículo endoplasmático e lisossomos apresentaram-se dispersos pelo citoplasma do trofozoíto. Foram visualizados citóstoma com dupla membrana e pregas citoplasmáticas interligando formas parasitárias durante o processo de divisão binária. Não foi verificado vacúolo parasitóforo nos eritrócitos parasitados por trofozoítos de *C. felis simile*. Conclui-se que *C. felis simile* é pleomórfico; os tipos morfológicos ovóide, alongado e anel-de-rubi são importantes para o diagnóstico hemoscópico da citauxzoonose felina no Brasil. A morfologia, a morfometria e os aspectos ultraestruturais de *C. felis simile* são similares aos observados em *C. felis* nos Estados Unidos da América e o agente estudado é uma espécie próxima de *C. felis*.

Palavras chave: *Cytauxzoon felis simile*, morfologia, morfometria, ultraestrutura, trofozoítos.

ABSTRACT

SCOFIELD, Alessandra. **Morphologic, morphometric and ultrastructural characterizations of intraerythrocytic forms of *Cytauxzoon felis simile***. Seropédica: UFRRJ, 2002. 76p. (Dissertation, Magister Science in Veterinary Science, Veterinary Parasitology).

The morphological, morphometric and ultrastructural characteristics of the intraerythrocytic trophozoites of two Brazilian isolates of *Cytauxzoon felis simile* from jaguar (*Panthera onca*) and small wild cat (*Felis tigrina* = *Leopardus tigrinum*) were described. The morphological parameters from the length, the diameter and the morphometric index (MI = diameter/length) for each type of parasitic form were measured. A total of 1,605 trophozoites were analysed. Point-shaped ($1.80 \pm 0.24 \times 1.60 \pm 0.19 \mu\text{m}$), pear-shaped ($2.32 \pm 0.60 \times 1.73 \pm 0.32 \mu\text{m}$), ring-shaped ($2.21 \pm 0.34 \times 1.86 \pm 0.29 \mu\text{m}$), ovoid ($2.18 \pm 0.36 \times 1.94 \pm 0.35 \mu\text{m}$), elongated ($2.45 \pm 0.34 \times 1.76 \pm 0.29 \mu\text{m}$) and tetrad forms ($1.80 \pm 0.10 \times 1.56 \pm 0.09 \mu\text{m}$) were observed. The ovoid, elongated and ring-shaped morphological types were predominant and both isolates were characterized as pleomorphic. The ultrastructural analysis on *C. felis simile* intraerythrocytic trophozoites from domestic cats, experimentally infected with the isolate from the jaguar showed double cytoplasmic membrane, excentric single nucleus surrounded by a double membrane, nonplicated mitochondria with a double membrane and usually situated opposite to the nucleus, and double-walled food vacuoles. Extra nuclear microtubules, ribosomes, endoplasmic reticulum and lisosomes were present dispersed in the cytoplasm. *C. felis simile* trophozoites have cytostome with double membrane and cytoplasmic bridges between parasitic forms in division process. No parasitophorous vacuole was found surrounding *C. felis simile* trophozoites in parasitized erythrocytes. According to the results of this study, it was possible to conclude that *C. felis simile* is pleomorphic; ovoid, elongated and ring-shaped morphological forms are important for diagnosis of the feline cytauxzoonosis in Brazil; the morphological, morphometric and ultrastructural characteristics on *C. felis simile* are close to American *C. felis* and the protozoan studied is a closely related species to *C. felis*.

Key words: *Cytauxzoon felis simile*, morphology, morphometry, ultrastructure, trophozoites.

1. INTRODUÇÃO

Cytauxzoon spp Neitz & Thomas, 1948 (Apicomplexa: Theileriidae) são hemoparasitos, transmitidos por carrapatos, que causam enfermidades principalmente em ruminantes e felinos. Esses são biológica e morfológicamente caracterizados por realizarem esquizogonia em histiócitos, nos quais um único grande esquizonte é formado, e por apresentarem formas intraeritrocíticas diminutas com cromatina nuclear compacta e citoplasma hialino, típicas dos theilerídeos (NEITZ, 1956; SIMPSON *et al.*, 1985a; KOCAN *et al.*, 1992; SOARES, 2002). Apesar dessas características, pouco se conhece sobre detalhes morfológicos e ultraestruturais dos protozoários deste gênero.

A citauxzoonose foi primeiramente descrita em ruminantes domésticos e silvestres no continente africano (NEITZ, 1956; 1957). Posteriormente uma doença fatal foi reportada em felídeos doméstico na América do Norte (WAGNER, 1976; KIER *et al.*, 1982a;b; 1987). São conhecidas quatro espécies dentro deste gênero: *Cytauxzoon silvicaprae*, *Cytauxzoon strepsicerosi* e *Cytauxzoon taurotragi*, os quais infectam ungulados na África (NEITZ, 1956; BROCKLESBY, 1962; MEHLHORN *et al.*, 1994); e *Cytauxzoon felis*, que parasita, principalmente, felídeos nos Estados Unidos da América (EUA) (WAGNER *et al.*, 1976; 1980; GARNER *et al.*, 1996; MEIER & MOORE, 2000). Entretanto, esta última espécie tem sido reportada infectando ovinos nos EUA (KIER *et al.*, 1982a) e tigre de bengala na Alemanha (JAKOB & WESEMEIER, 1996).

Na América Latina, os primeiros registros de citauxzoonose felina, causada por *Cytauxzoon felis simile*, foram realizados no Brasil em leões (PEIXOTO *et al.*, 1999), em onça pintada (SOARES *et al.*, 1999a), em gato-do-mato pequeno (SOARES *et al.*, 1999b) e experimentalmente em gatos domésticos (SCOFIELD *et al.*, 1999; SOARES, 2002); todos no Estado do Rio de Janeiro.

A citauxzoonose felina cursa em gatos domésticos, lincas da Flórida e em tigre branco, nos EUA, e em tigre de bengala na Alemanha, de forma severa e fatal (WAGNER *et al.*, 1976; FERRIS, 1979; KIER *et al.*, 1982a; GARNER *et al.*, 1996; JAKOB & WESEMEIER, 1996). Em lincas americanos, pumas do Texas, puma da Flórida, guepardo e ovinos a doença é assintomática e de curso longo (ZINKL *et al.*, 1981; BUTT *et al.*, 1991; WEHINGER *et al.*, 1995; ROTSTEIN *et al.*, 1999). Esta enfermidade é verificada, ainda, determinando doença fatal em macaco rhesus no

Panamá, cujo agente etiológico envolvido é semelhante à *C. felis* (GARDINER, 1998). No Brasil, a enfermidade causada por *C. felis simile* cursa de forma severa em leões (PEIXOTO *et al.*, 1999) e com quadro brando em onça pintada, gato-do-mato pequeno e gato doméstico, sendo que nesta última espécie a infecção é crônica (SCOFIELD *et al.*, 1999; SOARES *et al.*, 2002).

O único transmissor de *C. felis* conhecido, experimentalmente, é o carrapato *Dermacentor variabilis* (BLOUIN *et al.*, 1984; 1987; KOCAN *et al.*, 1992). Contudo, para as espécies de *Cytauxzoon* que ocorrem no continente africano diversas espécies de ixodídeos tem sido incriminados como transmissores (NEITZ, 1956; BROCKLESBY, 1962; YOUNG *et al.*, 1980; JARDINE, 1992; MEHLHORN *et al.*, 1994).

A citauxzoonose vem ganhando importância devido à sua dispersão, patogenicidade para felino de companhia, por infectar bovinos e ovinos, e pelo fato de seu agente ser sido reportado em em primatas (ALLSOPP *et al.*, 1994; COX, 1994; BRONSDON *et al.*, 1999; KJEMTRUP *et al.*, 2000a,b; SOARES, 2002). No entanto, pouco conhecimento se tem a respeito de *Cytauxzoon* spp fora da América do Norte. Ademais, muitas dúvidas ainda persistem quanto a sua biologia, transmissão e os aspectos morfológicos e ultraestruturais.

O presente estudo teve como objetivos descrever os aspectos morfológico, morfométrico e ultraestrutural de formas eritrocíticas de *C. felis simile*, agente originalmente descrito no Brasil, em gato doméstico.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Breve histórico e aspectos gerais sobre a citauxzoonose

A citauxzoonose é uma hemoparasitose determinada por protozoários do gênero *Cytauxzoon* Neitz & Thomas, 1948, que acomete ruminantes domésticos, ruminantes silvestres e felídeos (NEITZ, 1956; 1957; BROCKLESBY, 1962; KIER *et al.*, 1987; SOARES, 2002). Descrita pela primeira vez na África do Sul, causando uma doença aguda em duiker (*Sylvicapra grimmia*) (NEITZ & THOMAS, 1948); logo em seguida foi reportada, em kudus (*Strepsiceros strepsiceros*) (NEITZ & de LANGE, 1956), e em elande (*Taurotragus oryx*) (MARTIN & BROCKLESBY, 1960). Nos Estados Unidos da América (EUA), em 1976, uma citauxzoonose fatal foi descrita em gato doméstico (WAGNER, 1976).

Os gêneros *Cytauxzoon* e *Theileria* possuem algumas semelhança. Entretanto, *Cytauxzoon* spp apresentam características biológicas e morfológicas que podem ser consideradas *sui generis*, principalmente quanto à esquizogonia tecidual, que pode ocorrer em diversos tipos de células mononucleares (NEITZ, 1957; KIER *et al.*, 1987), enquanto que *Theileria* spp realizam esquizogonia exclusivamente em linfócitos. Apesar do conhecimento biológico destes Theileriidae, alguns taxonomistas consideram os dois gêneros sinônimos e os agrupam em um único gênero, *Theileria* (LEVINE, 1971; GROOTENHUIS *et al.*, 1979). Outros preferem mantê-los separados (NEITZ, 1957; BARNETT, 1977; ALLSOPP *et al.*, 1994; UILENBERG, 1995).

Na maioria dos hospedeiros susceptíveis a *Cytauxzoon* sp., a enfermidade cursa com o quadro severo, geralmente agudo, de hipertermia, anorexia, perda de peso, anemia, icterícia, dispnéia, letargia, fraqueza, evoluindo para coma e morte (NEITZ, 1957; BROCKLESBY, 1960; GLENN & STAIR, 1984; KIER *et al.*, 1987; GARNER *et al.*, 1996; MEINKOTH *et al.*, 2000).

Uma ampla variedade de mamíferos, principalmente entre ruminantes e carnívoros, têm sido descritos como hospedeiros de *Cytauxzoon* sp. no continente africano e nos EUA (McCULLY *et al.*, 1970; YOUNG *et al.*, 1980; GLENN *et al.*, 1982; KIER *et al.*, 1982a; GARNER *et al.*, 1996; JAKOB & WESEMEIER, 1996). Recentemente, foi verificada citauxzoonose em primatas não humanos no Panamá (GARDINER, 1998).

No Brasil foi diagnosticada citauxzoonose primeiramente em leões (PEIXOTO *et al.*, 1999), logo em seguida em onça pintada (SOARES *et al.*, 1999a) e gato-do-mato pequeno (SOARES *et al.*, 1999b). Posteriormente, estudos experimentais avaliando aspectos clínicos, patológicos e parasitológicos foram realizados em gatos domésticos (SCOFIELD *et al.*, 1999; SOARES, 2002).

2.2. Gênero *Cytauxzoon*

O gênero *Cytauxzoon* Neitz & Thomas, 1948 foi assim nominado para referir-se a dezenas ou centenas de diminutos (0,5 a 0,75 μm) corpos circulares regularmente distribuídos e realizando esquizogonia no citoplasma de histiócitos. Este parasita se multiplica por fissão binária simples em eritrócitos e por esquizogonia em histiócitos (NEITZ & THOMAS, 1948; NEITZ, 1956; 1957). Neste gênero, a espécie-tipo é *Cytauxzoon silvicaprae* Neitz & Thomas, 1948.

Até o momento, são reconhecidas quatro espécies pertencentes ao gênero *Cytauxzoon*: *Cytauxzoon silvicaprae* Neitz & Thomas, 1948; *Cytauxzoon strepsicerosi* Neitz & de Lange, 1956; *Cytauxzoon taurotragi* Martin & Brocklesby, 1960; *Cytauxzoon felis* Kier, 1979; porém existem suspeitas de que existam novas espécies (LOPEZ-REBOLLAR *et al.*, 1999; SOARES, 2002).

2.2.1. Citauxzoonose felina

Uma doença fatal foi descrita em quatro gatos domésticos (*Felis catus*) no Sudeste do Estado de Missouri, EUA, entre setembro de 1973 e junho de 1975. Esses animais apresentavam quadro grave que, á princípio, foram diagnosticados como anemia infecciosa felina (= hemobartonelose) com base no quadro clínico. No terceiro caso, contudo detectaram-se formas intraeritrocíticas com aspecto de anel de rubi ao esfregaço sangüíneo, sendo estabelecido então o diagnóstico *ante-mortem* de citauxzoonose (WAGNER, 1976).

Pelo acompanhamento clínico dos quatro gatos, verificou-se uma doença aguda e fatal caracterizada por hipertermia, anorexia, fraqueza, letargia, palidez de mucosas, desidratação, anemia, icterícia e morte. Observaram-se trofozoítas intraeritrocíticos com

média de parasitemia oscilando entre 1 e 4 % e formas predominantemente em anel de rubi, alongadas ou puntiformes, medindo 1 a 1,2 μm (WAGNER, 1976).

À necropsia havia icterícia generalizada, petéquias e equimoses na superfície do coração e dos pulmões e distensão do saco pericárdico com líquido seroso amarelado. Ao exame microscópico, encontraram-se, em diversos órgãos (pulmões, fígado, baço, coração, rins e vesícula biliar), formas esquizogônicas em diferentes fases de desenvolvimento, parasitando histiócitos e células retículo-endoteliais. Observou-se oclusão parcial ou total de vasos sanguíneos pelos esquizontes e marcada eritrofagocitose tecidual. Esquizontes pleomórficos continham centenas de pequenos corpos medindo de 0,1 a 0,2 μm (= merozoítas); outros esquizontes evidenciavam dezenas de corpos maiores (citômeros) com muitos dos pequenos corpos (WAGNER, 1976).

Com base nestas observações, a enfermidade foi primariamente descrita como uma citauxzoonose *simile* fatal em gatos (WAGNER, 1976). Mais tarde verificou-se que a doença era endêmica no Sudeste de Missouri, pois muitos casos de infecção natural surgiram com os mesmos aspectos clínico-patológicos (WAGNER, 1976; WAGNER *et al.*, 1976). A enfermidade foi reproduzida em outros gatos domésticos pela inoculação de sangue e fragmento de baço, por passagens consecutivas; todos os animais inoculados apresentaram doença aguda e morreram entre 7 e 12 dias após inoculação (WAGNER *et al.*, 1976). Os estudos iniciais evidenciaram que o gato doméstico é o hospedeiro definitivo terminal para esta citauxzoonose (WAGNER, 1976; WAGNER *et al.*, 1976).

Inicialmente pensou-se que esta nova doença de gatos americanos estava restrita ao Sudoeste de Missouri. A enfermidade porém, foi posteriormente registrada nos Estados do Texas, Arkansas e Geórgia. Em todos os casos, os animais estavam parasitados por carrapatos ou co-habitavam locais com bovinos, eqüinos, caprinos, ovinos ou com cães parasitados por carrapatos (WAGNER, 1976; WAGNER *et al.*, 1976; WIGHTMAN *et al.*, 1977; FERRIS, 1979).

Estes fatos levantaram o interesse na investigação da doença em outros mamíferos, especialmente animais de produção, bem como no seu potencial zoonótico, principalmente pelos seguintes motivos: i) a citauxzoonose só havia sido descrita em ungulados na África (NEITZ, 1956); ii) felinos ocorrem em todos os continentes e iii) animais silvestres são transportados de um continente para outro continuamente e, são

encontrados em todos os países (WAGNER, 1976; WAGNER *et al.*, 1976; WIGHTMAN *et al.*, 1977; FERRIS, 1979).

Adicionalmente, o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos concentrou esforços para melhor compreender esta enfermidade, descobrir sua relação com as citauxzoonoses africanas e verificar o potencial de infecção para animais de produção americanos. Mais de 500 gatos foram estudados sob condições experimentais e outros sob condições naturais e mais de 100 passagens seriadas do agente foram feitas para compreender as doenças natural e experimental, o diagnóstico diferencial, o prognóstico e a epizootiologia (FERRIS, 1979).

Ainda assim, muitas dúvidas permaneciam, como por exemplo: existe esta doença em gatos em outros continentes ou ilhas? A doença tem potencial para se dispersar? É cosmopolita ou regional? Quais os hospedeiros e reservatórios? O que é realmente o agente etiológico (espécie)? (WAGNER *et al.*; 1976; FERRIS, 1979).

2.3. *Cytauxzoon felis*

O agente etiológico da doença fatal para gato doméstico, semelhante à citauxzoonose dos ungulados africanos foi inicialmente diagnosticado, nos EUA, baseado nos caracteres morfológicos e biológicos, especialmente das formas esquizogônicas, sendo tentativamente classificado como pertencente ao gênero *Cytauxzoon* Neitz & Thomas, 1948, família Theileriidae (WAGNER, 1976; WAGNER *et al.*, 1976).

Posteriormente, com base em estudos de ultraestrutura, histológicos, tipos de célula infectada e modo de multiplicação, o protozoário foi nominado *Cytauxzoon felis*. Esta nomeação, no entanto, não responde aos requisitos do Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (CINZ) (UILENBERG, 1995), pois foi dada no trabalho de tese de Ann B. Kier, o qual não é um documento aceito pelo CINZ. Logo em seguida, contudo, foram publicados os estudos clínico-patológico e da transmissão experimental do agente para gatos domésticos e para 30 espécies de mamíferos domésticos e silvestres; citando e considerando a espécie em questão como *C. felis* Kier, 1979 (KIER *et al.*, 1982a,b). Pelo fato da literatura internacional reconhecer até o presente momento os estudos e a nomeação dada por Ann B. Kier, trataremos a espécie como *C. felis* Kier, 1979.

2.3.1. Filogenia e evolução

O filo Sporozoa compreende um pequeno, coerente e aparentemente monofilético grupo de protozoários, contendo cerca de 4.000 a 5.000 espécies estimadas (LEVINE, 1988; COX, 1994; ALLSOPP *et al.*, 1994; XIAO *et al.*, 1999; KJEMTRUP *et al.*, 2000b), que possuem o ciclo biológico complicado e uma estrutura denominada complexo apical característica e especializada para o grupo (COX, 1994). Não está bem certa a origem dos Sporozoa, se foi dos amoebae, zooflagelados, fungos ou fitoflagelados (WOLTERS, 1991; COX, 1994). Entretanto, existe um consenso de que os mesmos têm uma estreita relação evolutiva com os dinoflagelados, que são relacionados aos ciliados, apesar de existirem lacunas entre os dinoflagelados e ciliados e o complexo ciclo biológico dos Sporozoa (WOLTERS, 1991).

Acredita-se que apenas 1% dos esporozoários existentes são conhecidos (WOLTERS, 1991; COX, 1994), e provavelmente muitas espécies desapareceram com a extinção natural de seus hospedeiros ou decorrente da atividade humana (SPRENT, 1992; COX, 1994)

A análise de fragmentos de DNA e/ou RNA tem sido utilizada para determinar a distância evolutiva, verificando, por meio de seqüências de nucleotídeos, a tendência de determinadas espécies divergirem ao longo do tempo. Os resultados dessas análises são mais regulares que a avaliação de caracteres morfológicos (ALLSOPP *et al.*, 1994; COX, 1994; KJEMTERUP *et al.*, 2000a,b). Torna-se mais seguro, todavia, associar as análises moleculares às morfológicas e biológicas. Assim, a análise por parcimônia é o mais eficiente método para estudos de filogenia e evolução, especialmente quando inclui dados morfológicos, moleculares e ciclo biológico (WOESE, 1981; STEWART, 1993; COX, 1994).

Os Piroplasmida foram colocados como grupo próximo aos Amoebae, porém, os primeiros realizam reprodução sexuada (COX, 1994). Alguns autores colocaram-nos sistematicamente próximos aos Coccidia, enquanto outros relacionaram-nos aos Haemosporida (LEVINE, 1988; MEHLHORN, 1988). Como se vê, a classificação dos Piroplasmida não está bem clara e não satisfaz ao que se conhece à respeito deste grupo (COX, 1994).

A ordem Piroplasmida possui duas famílias de importância, Babesiidae e Theileriidae. A primeira família, com o gênero *Babesia*, contém cerca de 90 espécies (LEVINE, 1988), a segunda, com o gênero *Theileria*, contém cerca de 40 espécies

(LEVINE, 1988); o gênero *Cytauxzoon*, até o momento, apresenta apenas quatro espécies reconhecidas (SOARES, 2002).

A expansão evolucionária dos piroplasmídeos também tem relação à movimentação de seus hospedeiros, a exemplo do que ocorreu com *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* para bovinos (KUTTLER, 1988). Ou principalmente, com a dispersão dos vetores, como exemplo *Boophilus* sp. para babésias de bovinos; *Amblyomma* sp. para *T. mutans* e *Theileria velifera*; *Rhipicephalus sanguineus* para *Babesia canis*, dentre outros (NEITZ, 1956; 1957; KUTTLER, 1988; KAKOMA & MEHLHORN, 1994; MEHLHORN *et al.*, 1994). Assim, a expansão evolucionária dos Piroplasmida tem estreita relação com a biologia dos carrapatos vetores, bem como a exploração animal pelo homem.

A análise de seqüências de RNA ribossomal 18S revela que teilerídeos constituem em um grupo monofilético, assim como alguns membros da família Babesiidae; ambas as famílias são grupos irmãos e derivados de um ancestral parafilético comum (ALLSOPP *et al.*, 1994; COX, 1994). A aparente ausência de esquizogonia tecidual entre as babésias não é uma condição ancestral, pois pode ter ocorrido a perda deste processo de divisão com a evolução do grupo, a exemplo do que ocorreu com algumas gregarinas (COX, 1994).

Para alguns autores, o grupo parafilético que originou os taxa monofiléticos *Babesia stricto sensu* e *Theileria stricto sensu* também deram origem a outro taxa monofilético, o qual contém as espécies *Babesia equi*, *Babesia rodhaini* e *C. felis* (ALLSOPP *et al.*, 1994). Para estes autores, os três piroplasmídeos encontram-se em uma posição taxonômica incerta, apesar de possuírem seqüências de RNA similares às teilerias e babésias. Assim, foi sugerido, com base em similaridades fenotípicas e filogenéticas, que as três espécies, juntamente com as babésias de aves, formam uma nova família. Pelo fato de ter sido proposta a reclassificação de *Babesia equi* para *Nicolliia equi* (KRYLOV, 1981, citado por ALLSOPP *et al.*, 1994), o nome apropriado para esta nova família seria Nicolliidae (ALLSOPP *et al.*, 1994).

Recentemente observou-se que as babésias classicamente conhecidas (*Babesia stricto sensu* = *B. bigemina*, *B. canis*, *B. bovis*, *B. gibsoni*, *B. caballi* etc.) pertencem a um grupo monofilético; o subgrupo *Theileria stricto sensu* (= *T. parva*, *Theileria annulata*, *Theileria buffeli* etc.) que em conjunto com o subgrupo de *C. felis* e o subgrupo de *B. equi* formam um grupo monofilético; *Babesia felis*, *B. rodhaini* e *Babesia microti* formam mais um grupo. Todos são originários de um ancestral

parafilético, que provavelmente também deu origem ao gênero *Plasmodium* (KJEMTRUP *et al.*, 2000 a,b).

Adicionalmente, tem sido observado que o gênero *Entopolypoides*, em especial a espécie *Entopolypoides macaci*, tem estreita relação com *B. microti*, inferindo-se que o primeiro gênero seja sinônimo de *Babesia* (BRONSDON *et al.*, 1999). Tem sido verificado, também, que esporozoários da classe Coccidea são originários do mesmo grupo parafilético que originou a classe Piroplasma (XIAO *et al.*, 1999).

Apesar da complexidade na filogenia dos Piroplasmida, a tendência é o consenso de que o filo Sporozoa constitui em um grupo monofilético dos protozoários que possuem complexo apical.

2.3.2. Posição sistemática e *status* taxonômico

Na classificação taxonômica atual dos seres vivos, o táxon superior é denominado domínio, o qual, possui três grandes grupos: Archaea, Bacteria e Eucarya (WOESE, 1981; 1994). No domínio Archaea, encontram-se os microrganismos extremófilos; no domínio Bacteria, encontram-se as bactérias Gram-positivas, as bactérias fotossintetizantes, as cianobactérias e as espiroquetas; no domínio Eucarya, encontram-se os demais seres vivos (WOESE, 1994).

Até o momento, foram propostas diversas classificações taxonômicas para os protozoários, muitas delas baseadas apenas em caracteres morfológicos ou por simples agrupamento combinatório de caracteres. Assim, a posição sistemática do gênero *Cytauxzoon* seria melhor definida baseando-se na associação de diversos parâmetros morfológicos, biológicos, fisiológicos e patológicos, definidos pelos trabalhos de NEITZ (1956; 1957), WAGNER (1976), CAVALIER & SMITH (1993) e COX (1994).

O *status* taxonômico de *Cytauxzoon* spp ainda encontra-se incerto. Para NEITZ (1956), na família Theileriidae du Toit, 1918 encontram-se protozoários que se multiplicam por esquizogonia em linfócitos e finalmente invadem eritrócitos. As formas eritrocíticas não se reproduzem e são possíveis gametócitos ou gametas. Esta família é representada por um único gênero *Theileria*, cuja principal espécie seria *T. parva*.

Na família Gonderidae Neitz & Jansen, 1956, encontram-se parasitos que se multiplicam por esquizogonia em linfócitos (*Gonderia* sp.) ou em histiócitos (*Cytauxzoon* sp.) e também em eritrócitos. Nas hemácias se reproduzem por divisão binária, originando dois ou quatro indivíduos filhos, que posteriormente assumem a

característica forma de cruz-de-malta. O estágio final do parasita no eritrócito é possivelmente um gametócito ou gameta. Esta família é representada por dois gêneros, *Gonderia* e *Cytauxzoon* (NEITZ, 1956).

Os membros do gênero *Gonderia* se multiplicam por esquizogonia em linfócitos e por fissão em eritrócitos. Possuem diversas espécies: *Gonderia annulata*, *Gonderia mutans*, *Gonderia hirci*, *Gonderia ovis*, *Gonderia lawrencei*, entre outras (NEITZ, 1956).

Os membros do gêneros *Cytauxzoon* se multiplicam por esquizogonia em células da série histiocítica e por fissão em eritrócitos (NEITZ, 1956). Atualmente são conhecidas quatro espécies *C. sylvicaprae*, *C. strepsicerosi*, *C. taurotragi* e *C. felis* (SOARES, 2002).

O gênero *Gonderia* posteriormente foi considerado sinonímia de *Theileria* (LEVINE, 1971; 1985) e todos os piroplasmídeos que realizam esquizogonia em linfócitos foram classificados como *Theileria* spp. Alguns autores todavia, consideram o gênero *Cytauxzoon* como *Theileria* (LEVINE, 1971;1985; GROOTENHUIS *et al.*, 1979) e outros, baseados em diversos parâmetros citados anteriormente, o mantém na condição original (WAGNER, 1976; KIER *et al.*, 1982a,b; ALLSOPP *et al.*,1994). No presente trabalho, concordando com a última colocação, será adotada a nomenclatura original do gênero.

Desta forma, de acordo com SOARES (2002) a posição sistemática do parasita em estudo pode ser assim definida:

Domínio – Eucarya

Reino – Protozoa

Sub-reino – Alveolata

Super-filo – Apicomplexa

Filo – Sporozoa

Classe – Piroplasma

Ordem - Piroplasmida

Família – Theileriidae

Gênero – *Cytauxzoon*

Espécie – *Cytauxzoon felis*

Provável Sub-espécie – *Cytauxzoon felis simile*. No presente trabalho será utilizada esta nomenclatura, pois até o momento os isolados brasileiros não foram nominados (SOARES, 2002).

2.3.3. Biologia, morfologia e ultraestrutura

2.3.3.1. Formas intrahistiocíticas

O carrapato inocula no hospedeiro esporozoítas que infecta histiócitos para formar esquizontes (KOCAN *et al.*, 1992). Para *C. felis* apenas um esporozoíta infecta um histiócito. O desenvolvimento do parasito sob observação ultraestrutural, começa como uma indistinguível massa dentro do citoplasma da célula hospedeira, que progressivamente torna-se mais densa. Com o desenvolvimento, a divisão nuclear ocorre e vários núcleos individualizados tornam-se mais evidentes com o aumento da densidade do nucleoplasma e o aparecimento da membrana nuclear (SOARES, 2002).

Neste estágio, o parasito inicia um processo de multilobulação, cujos lóbulos são interconectados por numerosas pontes citoplasmáticas. Com o aumento de tamanho e complexidade do parasito, organelas são formadas ao longo das margens da membrana do parasito. O citóstoma torna-se visível no plasmalema, inicia-se o aparecimento do retículo endoplasmático, do anel polar, da mitocôndria não pregueada e o núcleo torna-se mais denso que o citoplasma (SOARES, 2002). Com o desenvolvimento, aumentam

as lobulações e as róprias aparecem no ápice das lobulações. Os merozoítas surgem da fissão multinucleada de um único esporonte existente nesta fase. Os citômeros são porções desenvolvidas deste único esporonte, interconectadas por numerosas pequenas pontes citoplasmáticas (KOCAN *et al.*, 1992).

A massa do parasito diminui de tamanho, formando o corpo residual e os merozoítas permanecem associados ao corpo residual que contém o núcleo do parasito e organelas (SOARES, 2002). Os merozoítas são produzidos a partir de um arranjo com aspecto de roseta em torno do pequeno corpo residual (SIMPSON *et al.*, 1985a; KOCAN *et al.*, 1992; SOARES, 2002). O merozoíta formado contém um único núcleo em posição oposta às róprias e aos micronemas. Assim, diversos merozoítas em desenvolvimento permanecem nutrindo-se no citoplasma da célula hospedeira até sua completa maturação (SIMPSON *et al.*, 1985a).

Aparentemente, a ruptura da célula hospedeira só ocorre após a completa maturação dos merozoítas (SIMPSON *et al.*, 1985a; SOARES, 2002).

As marcantes diferenças na esquizogonia entre *Theileria* sp. e *Cytauxzoon* sp. fundamentam-se no fato de que, no primeiro gênero, este processo ocorre apenas em linfócitos e no segundo, em histiócitos. No gênero *Cytauxzoon* sp., apenas um único esporozoíta invade a célula hospedeira para desenvolver o esquizonte, enquanto em *Theileria* sp. muitos esporozoítas invadem linfócitos, dando origem a vários esquizontes (MEHLHORN & SCHEIN, 1984; KOCAN *et al.*, 1992; MEHLHORN *et al.*, 1994).

Os esquizontes de *C. felis* são pleomórficos, com formas predominantemente arredondadas com dimensão variando entre 15 e 250 µm de diâmetro (WAGNER, 1976; WAGNER *et al.*, 1976; KIER *et al.*, 1987; PEIXOTO *et al.*, 1999; SOARES, 2002). A esquizogonia em *C. felis* parece ser um processo de curta duração e limitado (BLOUIN *et al.*, 1987). Experimentalmente observou-se que após inoculação de esporozoítas por adultos de *Dermacentor variabilis*, em gatos domésticos, os esquizontes foram visualizados nos tecidos aos 11 dias após inoculação. Aos 30 dias após inoculação, via carrapato, não mais havia esquizontes, permanecendo os animais portadores de formas intraeritrocíticas, com baixa parasitemia, por longo período (BLOUIN *et al.*, 1987). Por outro lado, o inóculo de fragmentos de tecidos de felídeos (gato doméstico ou lince) com esquizontes em gatos domésticos e/ou lince resultou na formação de esquizontes, baixa parasitemia de formas eritrocíticas e doença grave, com morte entre sete e 20 dias (WAGNER *et al.*, 1976; WIGHTMAN *et al.*, 1977; FERRIS, 1979; WAGNER *et al.*, 1980; KIER *et al.*, 1982a,b; 1987).

2.3.3.2. Formas intraeritrocíticas

O merozoíta maduro livre possui uma camada enrugada sobre a membrana plasmática e entra no eritrócito circulante por um processo semelhante à endocitose. Quando o merozoíta entra em contato com o eritrócito, a membrana deste inicia um processo de modificação no ponto de contato com o merozoíta, invaginando-se. À proporção que o merozoíta entra na célula, a invaginação alarga-se e aprofunda-se para acomoda-lo. A margem da membrana invaginada fica intimamente aderida ao merozoíta. A camada enrugada do merozoíta desaparece quando o mesmo está parcialmente internalizado. Estando o merozoíta dentro do eritrócito, a membrana invaginada funde-se, abraçando o merozoíta e formando um vacúolo (KOCAN *et al.*, 1992).

A entrada do merozoíta ocorre sem ruptura da membrana do eritrócito, porém o merozoíta sofre fissão binária, dando origem à trofozoítas, com capacidade de invadir outros eritrócitos.

Sob exame ultraestrutural, as formas intraeritrocíticas possuem uma dupla membrana citoplasmática, núcleo pobremente definido contendo cromatina delicada, retículo endoplasmático, ribossomos livres, mitocôndrias não pregueadas, vacúolo alimentar e citóstoma na membrana plasmática que circunda o parasito (SIMPSON *et al.*, 1985b).

Nos eritrócitos, encontram-se usualmente um ou dois trofozoítas, eventualmente três ou quatro (em cruz-de-malta). As formas intraeritrocíticas podem ser ovais, arredondadas, anaplasmoídes (= puntiforme), piriformes, em anel de rubi, alongadas ou em tétrades. As formas arredondadas e em anel de rubi são as mais comuns (WAGNER, 1976; KIER *et al.*, 1982a,b; 1987; SIMPSON *et al.*, 1985b). A cromatina nuclear, geralmente periférica, cora-se basofílicamente e o citoplasma cora-se azul-hialino ou cora-se fracamente. Esta forma pode medir de 0,5 a 2,5 µm de diâmetro, mas usualmente atinge 0,5 a 1,5 µm de diâmetro, e encontra-se freqüentemente no centro ou excêntrico quanto à localização no eritrócito (WAGNER, 1976; KIER *et al.*, 1987; SIMPSON *et al.*, 1985b; GLENN & STAIR, 1984).

Normalmente, a parasitemia por *C. felis* é baixa, entre 0,5 e 5% e, na maioria dos casos, de infecção natural está em torno de 1% (WAGNER, 1976; WAGNER *et al.*, 1976; 1980; FERRIS, 1979; SIMPSON *et al.*, 1985b; BLOUIN *et al.*, 1987; KIER *et al.*, 1987; SCOFIELD *et al.*, 1999; SOARES, 2002). Estas formas de *C. felis*

permanecem infectando eritrócitos até o repasto do carrapato, para dar continuidade ao ciclo biológico. Os trofozoítas são infectantes para outros hospedeiros, via transmissão sanguínea iatrogênica, mas aparentemente dão origem apenas a novas formas eritrocíticas (BLOUIN *et al.*, 1984; 1987; SIMPSON *et al.*, 1985b).

2.3.3.3. Gametogonia e esporogonia

O ciclo de *C. felis* no carrapato ainda não é conhecido. Com base no ciclo de *C. taurotragi* em *R. appendiculatus* (YOUNG *et al.*, 1980) e nos fenômenos de gametogonia, singamia e esporogamia que ocorrem em todos os Piroplasmida (NEITZ, 1965; 1957; MEHLHORN & SCHEIN, 1984; KAKOMA & MEHLHORN, 1994; MEHLHORN *et al.*, 1994), poder-se-ia comentar resumidamente um possível ciclo: alguns trofozoítas nos eritrócitos sofrem diferenciação e quando são ingeridos pelo carrapato, formariam microgametócitos ou macrogametócitos que, posteriormente, dariam origem a micro ou macrogametas, respectivamente. Estes, por singamia, formariam o zigoto que penetraria em células intestinais e poderiam diferenciar-se em cineto. O cineto, via hemolinfa, invadiria os ácinos de glândulas salivares, sofreria esporogonia, com liberação de esporozoítas os quais seriam inoculados pelo carrapato (MEHLHORN & SCHEIN, 1984; KAKOMA & MEHLHORN, 1994; MEHLHORN *et al.*, 1994; SOARES, 2002).

2.3.4. Vetores

Os piroplasmídeos são transmitidos biologicamente apenas por carrapatos (NEITZ, 1956; BALASHOV, 1972; HOOGSTRAAL, 1985; SONESHINE, 1991; COX, 1994). Os theilerídeos são transmitidos essencialmente por carrapatos heteroxenos (NEITZ, 1956; MEHLHORN & SCHEIN, 1984; UILENBERG, 1995), apesar de existir um relato sobre *Boophilus annulatus* vindos dos EUA para a Alemanha terem transmitido *T. mutans* para bovinos (REICHENOW, 1935, citado por NEITZ, 1956).

Ainda não é conhecido, com certeza, o carrapato transmissor natural de *C. felis*. Experimentalmente, foi verificado que *D. variabilis* alimentados no estágio de ninfa em

lince (*Lynx rufus*) parasitado por *C. felis*, adquirem a infecção e transmitem para gato doméstico quando adulto (BLOUIN *et al.*, 1984). Esta constatação foi confirmada posteriormente com outros experimentos similares (BLOUIN *et al.*, 1987; KOCAN *et al.*, 1992).

De forma geral, a literatura considera *D. variabilis* como vetor natural de *C. felis* (KIER *et al.*, 1987; BUTT *et al.*, 1991; GARNER *et al.*, 1996; JAKOB & WESEMEIER, 1996). Por outro lado, vários autores têm observado, desde a descrição original da enfermidade (WAGNER, 1976), que nas áreas onde ocorre a doença em gato doméstico e lince, o carrapato mais prevalente é *Amblyomma americanum* (WAGNER, 1976; WAGNER *et al.*, 1976; 1980; WEHINGER *et al.*, 1995; GARNER *et al.*, 1996).

Citauzoonose fatal provavelmente causada por *C. felis* foi descrita em tigre branco (*Panthera tigris*) parasitado por adultos de *A. americanum*, no Nordeste do Estado da Flórida (GARNER *et al.*, 1996). Adicionalmente, em um estudo conduzido entre 1974 e 1991, na Flórida, para determinar a incidência de carrapatos em lince (*Lynx rufus floridianus*) e em puma ou pantera da Flórida (*Felis concolor coryi*), observou-se que estes animais (n= 189) eram parasitados principalmente por adultos de *Ixodes scapularis*, *Ixodes affinis*, *D. variabilis*, *A. americanum* e *A. maculatum* (WEHINGER *et al.*, 1995), sendo a espécie *I. scapularis* a mais incidente em ambos os hospedeiros. Assim, estes autores consideram que, principalmente, *I. scapularis* não pode ser desprezado como um potencial vetor de *C. felis* para estes felídeos (WEHINGER *et al.*, 1995).

As espécies de *Theileria* são transmitidas, principalmente, por carrapatos dos gêneros *Rhipicephalus* e *Hyalomma* (NEITZ, 1956; SCHEIN, 1975; MEHLHORN & SCHEIN, 1984; UILENBERG, 1995). As espécies do gênero *Cytauxzoon* que acometem ungulados são transmitidas por *Rhipicephalus* spp. *T. mutans* e *T. velifera*, que ocorrem tanto na África quanto no Caribe, são transmitidos por diversas espécies do gênero *Amblyomma*: *Amblyomma variegatum*, *Amblyomma hebraeum*, *Amblyomma gemma*, *Amblyomma lepidum*, *Amblyomma coherens* etc (NEITZ, 1956; MEHLHORN *et al.*, 1994; UILENBERG, 1995). *Theileria cervi*, que ocorre na América do Norte, é transmitido principalmente por *A. americanum* (HAZEN-KARR *et al.*, 1987; MEHLHORN *et al.*, 1994).

Curiosamente, em 1828, *A. variegatum*, uma espécie africana, foi introduzida na ilha de Guadalupe, no Caribe, por meio de um carreamento de bovinos provenientes do Senegal. A partir de 1973, esse ixodídeo tem-se disseminado rapidamente pela região do

Caribe, com a média de uma ilha infestada por ano. Atualmente, grande parte das ilhas do Caribe encontra-se infestada (HONER, 1990). A simulação ecoclimática da América do Sul mostrou que *A. variegatum* tem potencial de ser introduzido na maior parte do território brasileiro, especialmente por meio de aves migratórias que utilizam o Brasil como rota e/ou ponto de migração (HONER, 1990). Esta espécie de carrapato é uma das principais vetoras de *Theileria* spp no continente africano e no Caribe (NEITZ, 1956; MEHLHORN *et al.*, 1994; UILENBERG, 1995).

No Brasil, foi verificado o parasitismo por *Amblyomma cajennense* em leões cativos que morreram por citauxzoonose (PEIXOTO *et al.*, 1999). Na mesma localidade, outros felinos como onça pintada e gato-do-mato pequeno também encontravam-se naturalmente parasitados por *C. felis simile* (SOARES *et al.*, 1999a;b). No entanto, ainda não é conhecido o transmissor deste Theileriidae no País.

2.3.5. Hospedeiros

Cytauxzoon felis foi originalmente descrito parasitando gato doméstico (*Felis catus*) (WAGNER, 1976; WAGNER *et al.*, 1976; WIGHTMAN *et al.*, 1977), no qual determinava invariavelmente uma doença fatal (FERRIS, 1979; WAGNER *et al.*, 1980; KIER *et al.*, 1987) e de curso rápido, o que levou os pesquisadores a considerarem ser o gato doméstico como um hospedeiro acidental e/ou final para o parasito (KIER *et al.*, 1982a,b; 1987; SIMPSON *et al.*, 1985a,b; BLOUIN *et al.*, 1987).

Posteriormente, verificou-se que a inoculação de esquizontes e trofozoítas foi bem sucedida em duas espécies de linces, sendo que o lince americano (*L. rufus rufus*) apresentou apenas formas sangüíneas e não desenvolveu a doença, enquanto o lince da Flórida (*L. rufus floridanus*) apresentou trofozoítas e esquizontes e desenvolveu uma doença fatal idêntica à observada em gatos (KIER *et al.*, 1982a,b). Nos EUA, diversos casos foram descritos, de linces americanos parasitados por *C. felis*. Na maioria deles, os animais apresentavam apenas formas intraeritrocíticas do parasito. Pelo inóculo de sangue desses animais em gatos, porém desenvolveu-se uma doença fatal com formação de esquizontes teciduais (GLENN *et al.*, 1982, 1983; KIER *et al.*, 1982a,b; BLOUIN *et al.*, 1984) (Tabela 1). Acredita-se, portanto, que o lince é o principal reservatório de *C. felis* na América do Norte (GLENN *et al.*, 1982, 1983; BLOUIN *et al.*, 1987; WEHINGER *et al.*, 1995).

Experimentalmente foi demonstrado que ovinos são susceptíveis à *C. felis* (Tabela 1). Estes animais não apresentam sintomas aparentes, mas desenvolvem uma baixa e persistente parasitemia (KIER *et al.*, 1982a). Ao se avaliar experimentalmente o potencial de transmissão interespecíes de *C. felis*, proveniente de gato doméstico, para quatro espécies de animais domésticos de produção, nove espécies de animais de laboratório e 17 espécies de animais silvestres, observou-se que *C. felis* infectou apenas lince americano, lince da Flórida e ovino (KIER *et al.*, 1982a).

As infecções naturais por *C. felis* têm sido descritas (Tabela 1) em guepardo, com formas eritrocíticas e quadro assintomático (ZINKL *et al.*, 1981), em puma ou pantera da Flórida, com formas eritrocíticas e quadro assintomático (BUTT *et al.*, 1991; ROTSTEIN *et al.*, 1999); em tigre branco, com formas eritrocíticas e esquizogônicas e doença fatal (GARNER *et al.*, 1996), em tigre de bengala, com formas eritrocíticas e esquizogônicas e doença fatal (JAKOB & WESEMEIER, 1996) e, em puma ou pantera do Texas, com formas eritrocíticas e quadro assintomático (ROTSTEIN *et al.*, 1999).

Recentemente verificou-se, em macaco rhesus, uma típica citauxzoonose, com formas esquizogônicas semelhantes à *C. felis* (GARDINER, 1998).

No Brasil, *C. felis simile* foi observado primeiramente em leões causando uma enfermidade severa e lesões patognomônicas, caracterizadas pela oclusão parcial ou total de vasos sangüíneos (PEIXOTO *et al.*, 1999). Em seguida foi diagnosticado o parasitismo por formas intraeritrocíticas típicas deste Theileriidae em onça pintada (SOARES *et al.*, 1999a) e em gato-do-mato pequeno (SOARES *et al.*, 1999b). Posteriormente, estudos experimentais avaliaram os aspectos clínicos, patológicos e parasitológicos em gatos domésticos (SCOFIELD *et al.*, 1999; SOARES, 2002).

Tab. 1. Hospedeiros naturais e experimentais e distribuição geográfica da infecção causada por *Cytauxzoon felis*.

Hospedeiro		Forma evolutiva do parasito observada	Doença	Distribuição	Observação
Nome científico	Nome vulgar				
<i>Felis catus</i>	Gato doméstico	Trofozoítas e esquizontes	Fatal, quando inóculo de esporozoítas ou esquizontes; branda, quando inóculo de trofozoítas	Estados Unidos da América (Sul, Sudeste, Centro-oeste e ao longo da costa do Golfo)	Quadro clínico variável tanto na infecção natural ou experimental
<i>Lynx rufus rufus</i>	Lince americano	Trofozoítas	Assintomática; baixa parasitemia	Estados Unidos da América	Infecção experimental. Inóculo pouco patogênico para gato doméstico
<i>Lynx rufus floridanus</i>	Lince da Flórida	Trofozoítas e esquizontes	Doença fatal; baixa parasitemia	Estados Unidos da América	Infecção experimental. Inóculo fatal para gato doméstico
<i>Lynx rufus</i>	Lince americano	Trofozoítas	Assintomática; baixa parasitemia	Estados Unidos da América (Oklahoma)	Infecção natural
<i>Felis concolor coryi</i>	Puma, leão da montanha, pantera da Flórida	Trofozoítas e esquizontes	Assintomática; baixa parasitemia	Estados Unidos da América (Nova York)	Não se sabe se a infecção foi natural ou iatrogênica, pois o animal recebeu transfusão sanguínea de outro puma. Inóculo fatal para gato doméstico
<i>Lynx rufus rufus</i> ^a (<i>Cytauxzoon simile</i>)	Lince americano	Trofozoítas	Assintomática; baixa parasitemia	Estados Unidos da América (Oklahoma)	Infecção natural De 4 lince, o inóculo de um foi fatal para gato doméstico
<i>Felis concolor coryi</i>	Puma, leão da montanha, pantera da Flórida	Trofozoítas	Assintomática; baixa parasitemia	Estados Unidos da América (Flórida)	Infecção natural
<i>Felis concolor stanleyana</i>	Puma, pantera do Texas	Trofozoítas	Assintomática; baixa parasitemia	Estados Unidos da América (Flórida)	Infecção natural
^b <i>Acinonyx jubatus</i> ^a (<i>Cytauxzoon simile</i>)	Guepardo	Trofozoítas	Assintomática; baixa parasitemia	Estados Unidos da América (Califórnia)	Infecção natural Inóculo não infectou gato doméstico
<i>Panthera tigris</i>	Tigre branco	Trofozoítas e esquizontes	Doença fatal	Estados Unidos da América (Flórida)	Infecção natural Animal parasitado por <i>A. americanum</i>
<i>Panthera tigris</i>	Tigre de bengala	Trofozoítas e esquizontes	Doença fatal	^c Europa, Alemanha (animal de zoológico)	Infecção natural Animal nasceu no local do óbito
<i>Ovis aries</i>	Ovino	Trofozoítas	Assintomática; baixa parasitemia	Estados Unidos da América	Infecção experimental
^d <i>Macaca mulatta</i>	Macaco rhesus	Esquizontes	Doença fatal	América Central, Panamá	Infecção natural
<i>Panthera leo</i> ^a (<i>Cytauxzoon felis simile</i>)	Leão	Esquizontes	Doença fatal	América do Sul, Brasil (animais de zoológico)	Infecção natural Animais (n=2) parasitados por <i>A. cajemense</i>
<i>Panthera onca</i> ^a (<i>Cytauxzoon felis simile</i>)	Onça pintada	Trofozoítas	Doença branda; baixa parasitemia	América do Sul, Brasil (animal de zoológico)	Infecção natural Animal parasitado por <i>A. cajemense</i> , inóculo patogênico para gato doméstico
<i>Felis tigrina</i> ^a (<i>Cytauxzoon felis simile</i>)	Gato-do-mato pequeno	Trofozoítas	Assintomático; baixa parasitemia	América do Sul, Brasil (animal de zoológico)	Infecção natural Inóculo patogênico para gato doméstico
<i>Felis catus</i> ^a (<i>Cytauxzoon felis simile</i>)	Gato doméstico	Trofozoítas	Doença branda; baixa parasitemia	América do Sul, Brasil (Rio de Janeiro)	Infecção experimental Inóculo de <i>P. onca</i> e <i>F. tigrina</i>

^aAgente etiológico considerado pelo(s) autor(es) como gênero ou espécie semelhante (= *simile*).

^bEstes animais (casal) nasceram em Oregon, EUA e viveram dois meses na Namíbia, África. Ao retornarem aos EUA o macho apresentou claudicação (ZINKL *et al.*, 1981).

^c14 meses antes da morte deste animal, três lince jovens provenientes dos EUA foram introduzidos no zoológico (JAKOB & WESEMEIER, 1996).

^dGARDINER, C. H. 1998. Comunicação pessoal. (Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC, EUA).

2.3.6. Diagnóstico

2.3.6.1. Diagnóstico direto

O diagnóstico direto de citauxzoonose é baseado, principalmente, na observação de formas intraeritrocíticas e/ou formas esquizogônicas teciduais, típicas do agente. O diagnóstico de trofozoíta é feito pela confecção de esfregaço a partir de sangue periférico, obtido por punção de vasos marginais. Estes esfregaços são, preferencialmente, fixados em metanol absoluto e podem ser corados por derivados do Romanowsky como Giemsa, Leishman, May-Grünwald-Giemsa etc, ou por laranja de acridina (BOBADE & NASH, 1987; MacWILLIAMS, 1987; FOREYT, 1989; SOARES, 2002).

O exame sob microscopia óptica de luz deve basear-se na verificação de formas intraeritrocíticas de pequeno porte (0,5 – 1,5 μm x 0,8 – 2,0 μm), predominantemente arredondadas e em forma de anel de rubi. Estes tipos morfológicos encontram-se em posição central no eritrócito. Formas em téttrade também ocorrem, porém em menor frequência. Os trofozoítas possuem cromatina nuclear basofílica e de localização periférica e citoplasma azul-hialino fracamente corado (WAGNER, 1976; WIGHTMAN *et al.*, 1977; GLENN & STAIR, 1984; SIMPSON *et al.*, 1985a,b; KIER *et al.*, 1987; MEIER & MOORE, 2000; SOARES, 2002).

As formas intrahistiocíticas podem ser diagnosticadas por citologia de fragmentos de tecidos e órgãos. Na observação citológica de aposições ou “arrastes” de tecidos e órgãos, processados como descrito para esfregaços de sangue, pode-se verificar histiócitos contendo no citoplasma esquizontes com citômeros e inúmeros merozoítas. Na observação de tecidos processados por técnicas histológicas e corados por hematoxilina-eosina ou por Giemsa, verificam-se histiócitos repletos de esquizontes, com citômeros e merozoítas, aderidos ao endotélio de vasos sanguíneos de diversos órgãos (FERRIS, 1979; WAGNER *et al.*, 1980; KIER *et al.*, 1982b; 1987; GLENN & STAIR, 1984; GARNER *et al.*, 1996; JAKOB & WESEMEIER, 1996; MEIER & MOORE, 2000; SOARES, 2002).

Cabe salientar, porém, que as formas intraeritrocíticas de *C. felis*, quando da infecção via carrapato, aparecem na corrente sanguínea geralmente entre um e três dias após o surgimento de esquizontes, período que antecede a morte e no qual surgem os sintomas (HAUCK *et al.*, 1982; SIMPSON *et al.*, 1985a,b; BLOUIN *et al.*, 1987; KIER *et al.*, 1987; MEIER & MOORE, 2000; SOARES, 2002).

A parasitemia por *C. felis* usualmente é baixa (0,5 a 3%) e persistente por um longo período, o animal também pode permanecer portador crônico assintomático (WAGNER *et al.*, 1980; KIER *et al.*, 1987; HOOVER *et al.*, 1994; WALKER & COWELL, 1995; MEINKOTH *et al.*, 2000; SCOFIELD, 1999; SOARES, 2002). Ademais, pelo fato da esquizogonia ser limitada, e aparentemente transitória, o animal pode resistir à infecção e não apresentar esquizontes, persistindo apenas parasitos intraeritrocíticos (SIMPSON *et al.*, 1985b; BLOUIN *et al.*, 1987; KIER *et al.*, 1987; KOCAN *et al.*, 1992).

Pode-se proceder, ainda, o diagnóstico molecular, que é feito principalmente por meio da técnica da reação de polimerase em cadeia (PCR), a qual amplifica porções de fragmentos de gene do parasito utilizando *primers* específicos. Pela PCR, pode-se comparar ainda porções de RNA ribossomal 18S de *C. felis* (acesso no banco de genes nº L19080) com outras espécies de *Cytauxzoon*, *Theileria* e *Babesia* disponíveis no Banco Internacional de Genes (www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide) (ALLSOPP *et al.*, 1994; KJEMTRUP *et al.*, 2000b; MEINKOTH *et al.*, 2000).

2.3.6.2. Diagnóstico indireto

O diagnóstico sorológico tem sido feito pela detecção de anticorpos da classe IgG por meio da técnica de imunofluorescência indireta e pelo imunoenensaio microfluorimétrico. Ambas as provas utilizam formas esquizogônicas como antígeno (SHINDEL *et al.*, 1978; UILENBERG *et al.*, 1987; COWELL *et al.*, 1988). Estes ensaios, além de serem um meio indireto de diagnóstico, contribuem para o conhecimento de possíveis animais portadores em estado subclínico e para a epidemiologia, determinando a prevalência e distribuição da enfermidade.

2.3.6.2.1. Diagnóstico auxiliar

Os exames hematológico e bioquímico são auxiliares no diagnóstico da citauxzoonose. As alterações mais frequentes e importantes são anemia normocítica normocrômica, leucopenia, trombocitopenia, decréscimo do volume globular e da concentração de albumina, aumento da concentração de proteínas plasmáticas totais, de

glicose e de alanina transaminase (KOCAN & BLOUIN, 1985; GARNER *et al.*, 1996; ROTSTEIN *et al.*, 1999).

Apesar das drogas derivadas das diamidinas e das naftoquinonas terem algum efeito contra *Cytauxzoon* spp, o diagnóstico terapêutico não é válido para a citauxzoonose felina devido à baixa eficácia das drogas (MOTZEL & WAGNER, 1990; WALKER & COWELL, 1995; GREENE *et al.*, 1999; MEINKOTH *et al.*, 2000).

2.3.6.3. Diagnóstico diferencial

Os aspectos clínicos das hemoparasitoses em geral são muito semelhantes, fato que, freqüentemente, contribui para falsos diagnósticos de citauxzoonose felina, quando na verdade trata-se, em muitos casos, de babesiose ou hemobartonelose (SOARES, 2002). A qualidade dos preparados citológicos ou teciduais, é um fator imprescindível para o correto diagnóstico de qualquer hematozoário, pois simples artefatos de técnica e sujidades freqüentemente confundem profissionais quando da observação microscópica. Assim, a acuidade e a cautela na diferenciação de hemoparasitos, especialmente no que diz respeito aos aspectos morfológicos e biológicos do possível agente em questão, devem ser considerados antes da definição diagnóstica (SOARES, 2002).

Diversos hemoparasitos têm sido objeto de dúvidas em relação a *C. felis* (Figura 1). *Haemobartonella felis* (Clark, 1942) é um microrganismo da ordem Rickettsiales parasita de eritrócitos de felídeos (CLARK, 1942; BOBADE & NASH, 1987; NEIMAK *et al.*, 2001). Esta riquetsia é considerada por muitos autores como o principal agente a ser diferenciado de *C. felis* (WAGNER, 1976; KIER *et al.*, 1987; FOREYT, 1989; MEIER & MOORE, 2000; SOARES, 2002). Morfologicamente, todavia, esse agente apresenta predominantemente formas cocóides e em cadeia, de coloração basofílica densa e homogênea, e tamanho diminuto (0,2 – 0,9 µm) e localizadas periféricamente na superfície do eritrócito (Figura 1, Tabela 2); portanto, formas completamente distinguíveis das de *C. felis* (WAGNER *et al.*, 1976; WIGHTMAN *et al.*, 1977; MacWILLIAMS, 1987; COWELL *et al.*, 1988; HOOVER *et al.*, 1994; SOARES, 2002).

Embora ocorra, aparentemente, com baixa prevalência em felídeos, *Babesia* spp até pode ser considerada mais importante na diferenciação (Figura 1) com *C. felis* que *H. felis* (Tabela 2). Os Babesiidae descritos que acometem felídeos são: *Babesia felis*

Davies, 1929; *Babesia cati* Mudaliar, Achiary & Alwar, 1950; *Babesia herpailuri* Dennig, 1967; *Babesia pantherae* Dennig & Brocklesby, 1972 e *Babesia* sp. Lopez-Rebollar, Penzhom, de Wall & Lewis, 1999 (espécie não-nominada; previamente codificada como pequeno piroplasma KNP). As características morfológicas, os hospedeiros e a distribuição destes agentes podem ser verificados na tabela 2.

Apesar de, eventualmente, haver alguma semelhança (Figura 1) entre determinados tipos morfológicos de *Babesia* spp com *C. felis* (SOARES, 2002), reservadas as devidas proporções e características (Tabela 2), não tem-se verificado reações sorológicas cruzadas entre estes dois agentes (UILENBERG *et al.*, 1987; BOURDEAU, 1996; LOPEZ-REBOLLAR *et al.*, 1999).

As formas esquizogônicas de *C. felis* presentes em tecidos podem ser consideradas patognomônicas para citauxzoonose, entretanto cabe salientar que esquizontes de *Hepatozoon* spp em felídeos também ocorrem em tecidos de diversos órgãos e, eventualmente, no endotélio de vasos (BEAUFLLS *et al.*, 1998; BENETH *et al.*, 1998; SOARES, 2002). Pseudocistos de *Toxoplasma gondii* poder ser visualizados em diversos órgãos e tecidos (FOREYT, 1989; HARMELIN *et al.*, 1992). Embora em menor frequência, ninho leishmanióide contendo formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi* são observados, também, em felídeos (HOARE, 1972; MacWILLIAMS, 1987; FOREYT, 1989; BARR *et al.*, 1993).

Tab. 2. Diagnóstico diferencial de *Cytauxzoon felis* com outros piroplasmídeos em carnívoros e *Haemobartonella felis*.

Parasito		Hospedeiro		Distribuição	Observação		
Gênero e espécie	^a Dimensões (µm)	^b Tipo morfológico	^c Posição	Nome científico	Nome vulgar		
<i>Babesia felis</i> Davies, 1929	0,7 x 1,25	Cruz-de-malta	Central	<i>Felis catus</i> <i>Felis ocreata</i> <i>Panthera pardus</i> <i>Panthera leo</i> <i>Acinonyx jubatus</i> <i>Felis concolor</i> <i>Lynx rufus</i>	Gato doméstico Gato sudanês Leopardo Leão Guepardo Puma Lince	África, Ásia, Europa	---
<i>Babesia cati</i> Mudaliar, Achary & Alwar, 1950	0,5 – 2,5 (diâmetro)	^d Piriforme, bigeminada	Excêntrica	<i>Felis sp.</i>	Gato silvestre	Índia	Experimentalmente não infecta gato doméstico
<i>Babesia herpailuri</i> Dennig, 1967	1,3 – 2,2 x 2,7	Piriforme, bigeminada	Central	<i>Herpailurus yagouaroundi</i> <i>Felis catus</i> <i>Canis familiaris</i> <i>Canis familiaris dingo</i> <i>Canis vulpes</i>	Gato mourisco Gato doméstico Cão doméstico Dingo australiano Raposa vermelha	América do Sul (Venezuela) ^e Alemanha Alemanha Alemanha	Infecção natural Infecção experimental Infecção experimental Infecção experimental
<i>Babesia pantherae</i> Dennig & Brocklesby, 1972	1,8 x 2,0	Piriforme, bigeminada, téttrade	Periférica	<i>Panthera pardus</i> <i>Panthera leo</i> <i>Felis catus</i>	Leopardo Leão Gato doméstico	África	---
<i>Babesia</i> sp. Lopez-Rebollar <i>et al.</i> , 1999	1,0 x 1,05	Redondo	Central	<i>Panthera leo</i>	Leão	África (África do Sul)	^f Parasito não nominado
<i>Haemobartonella felis</i> (Clark, 1942)	0,2 – 0,9 (diâmetro)	Cocóide, redondo; freqüentemente em cadeia	Periférica; na superfície do eritrócito	<i>Felidae</i>	Diversos membros da família Felidae	Cosmopolita	^g <i>Haemobartonella</i> spp, pertencem a ordem Rickettsiales

^aDiâmetro menor x diâmetro maior em micrômetros.

^bTipo morfológico freqüentemente observado em eritrócitos.

^cPosição quanto à localização freqüentemente observada no eritrócito.

^dPara *Babesia cati*, observa-se com freqüência mais de quatro formas por eritrócitos com aspecto de roseta.

^eInfecção experimental a partir de inóculo do hospedeiro natural proveniente da Venezuela.

^fPossivelmente espécie nova; previamente codificado como pequeno piroplasma KNP (LOPEZ-REBOLLAR *et al.*, 1999).

^gExistem propostas de transferir o gênero *Haemobartonella* para *Mycoplasma* (NEIMARK *et al.*, 2001).

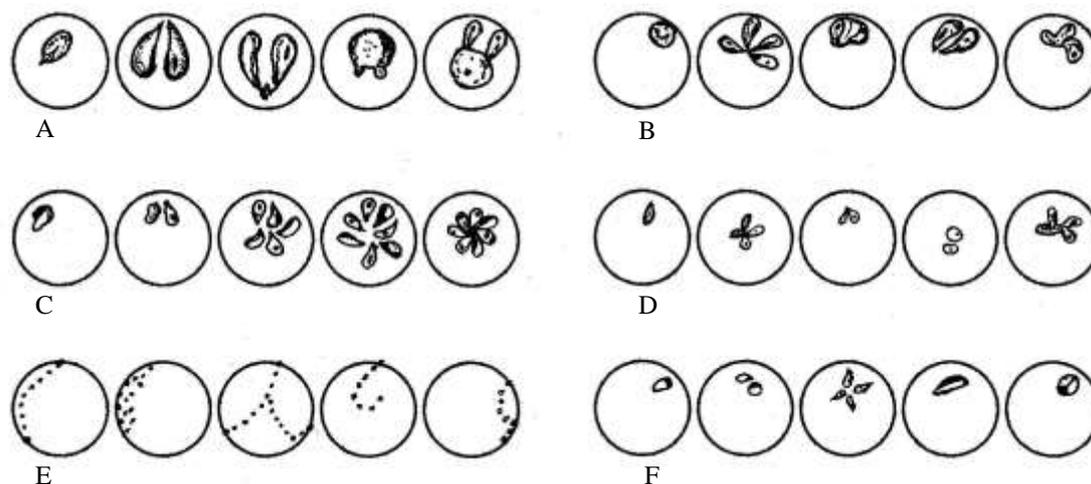


Fig. 1. Principais formas eritrocíticas de Piroplasmida e Rickettsia parasitas de felinos. A, *Babesia herpailuri*; B, *Babesia pantherae*; C, *Babesia cati*; D, *Babesia felis*; E, *Haemobartonella felis*; F, *Cytauxzoon felis*. (Adaptado de SOARES, 2002).

2.3.7. Tratamento

Poucas drogas têm sido reveladas úteis no controle de teilerioses durante a fase aguda da doença. Entre elas, as mais eficientes são a halofugisona, a parvaquone e a buparvaquone (MEHLHORN *et al.*, 1994). Os compostos derivados das diamidinas não apresentam eficácia no tratamento de teilerioses, porém são muito eficientes contra *Babesia* spp, o que indica que o metabolismo dos membros destas famílias é diferente (MEHLHORN & SCHEIN, 1984; PEREGRINE, 1994).

O lactato de halofugisona é uma droga derivada das quinazolinonas utilizadas como coccidiostático. Está droga possui eficácia contra *Theileria* spp, porém determina sintomas de intoxicação aguda, na qual o animal desenvolve diarreia profusa, caquexia, conjutivite e hipotermia (MEHLHORN *et al.*, 1994).

A parvaquone e a buparvaquone são naftoquinonas eficientes contra *Theileria* spp. A parvaquone atua tanto contra as formas intraeritrocíticas, quanto contra as formas intrahistiocíticas. Dois tratamentos, com intervalo de 48 horas, de 10 mg/Kg são eficientes para minimizar sinais clínicos de infecção em bovinos. Quando de recrudescência da infecção, no entanto, recomenda-se a utilização de duas doses de 20 mg/Kg, com intervalo de 48 horas. A buparvaquone tem sido reportada como mais efetiva que a parvaquone. Uma única dose de buparvaquone a 2,5 mg/Kg, cura bovinos com infecção clínica por *Theileria* spp (MEHLHORN *et al.*, 1994; PEREGRINE, 1994).

O aceturato de diaminazeno e o dipropionato de imidocarb são diamidinas eficientes e amplamente utilizadas no controle e no tratamento de *Babesia* spp (PEREGRINE, 1994), porém pouco se conhece sobre o seu efeito contra *Theileria* spp.

Apesar das naftoquinonas serem consideradas as melhores drogas teilericidas, essas não têm se mostrado eficientes contra *Cytauxzoon* spp. A avaliação de parvaquone na dose única de 20 ou 30 mg/Kg e de buparvaquone na dose de 5 ou 10 mg/Kg, revelou que ambas são ineficientes no tratamento da citauxzoonose felina experimental (MOTZEL & WAGNER, 1990).

A administração de aceturato de diaminazeno e de dipropionato de imidocarb, na dose única de 2mg/Kg, apresentou eficácia de 50% em gatos com infecção natural por *C. felis* (GREENE *et al.*, 1999). O tratamento, com dipropionato de imidocarb, em gatos com citauxzoonose experimental induzida, via carrapatos, foi ineficiente (MEINKOTH *et al.*, 2000).

O tratamento eficiente para a citauxzoonose ainda está por ser estabelecido. O uso de terapia de suporte com solução de Ringer lactato e analgésico, associada a diamidinas, parece apresentar melhor resultado (HOOVER *et al.*, 1994; GREENE *et al.*, 1999; MEINKOTH *et al.*, 2000). Contudo, cabe salientar que tanto o aceturato de diaminazeno quanto o dipropionato de imidocarb possuem moderada ação tóxica para felinos (GREENE *et al.*, 1999). Ambas as drogas são tóxicas também para outras espécies animais, inclusive bovinos (PEREGRINE, 1994). Ademais, quando de doença aguda, as drogas diamidinas devem ser administradas juntamente com heparina, mantendo-se a fluídoterapia (MEIER & MOORE, 2000).

2.3.8. Distribuição

A citauxzoonose felina foi observada em gato doméstico, primeiramente, no Sudeste do Estado de Missouri, EUA (WAGNER, 1976). Posteriormente foi diagnosticada na região de fronteira entre os Estados de Missouri e Arkansas (WAGNER *et al.*, 1976) e, em seguida, a enfermidade foi registrada nos Estados do Texas e Georgia (WIGHTMAN *et al.*, 1977).

Cytauxzoon simile foi reportado infectando naturalmente guepardos cativos (*A. jubatus*) no Estado da Califórnia (ZINKL *et al.*, 1981). Só em 1982, no Estado de

Oklahoma, foi diagnosticada a infecção por *Cytauxzoon* sp. em lincos (Tabela 1) naturalmente parasitados (GLENN *et al.*, 1982).

Posteriormente, a citauxzoonose foi registrada acometendo felinos domésticos e silvestres experimental e/ou naturalmente infectados em diversos estados americanos (Tabela 1), principalmente, nas regiões Sul, Sudeste, Centro-oeste e ao longo da costa do Golfo do México (FERRIS, 1979; HAUCK *et al.*, 1982; GLENN *et al.*, 1983; BUTT *et al.*, 1991; HOOVER *et al.*, 1994; WALKER & COWELL, 1995; GARNER *et al.*, 1996; ROTSTEIN *et al.*, 1999; MEINKOTH *et al.*, 2000). Experimentalmente, foi descrita a infecção em ovinos no Estado de Missouri (KIER *et al.*, 1982a).

A maioria dos casos de citauxzoonose felina foram observados nos EUA, adicionalmente, foi relatada citauxzoonose fatal em tigre de bengala (*P. tigris*) na Alemanha (JAKOB & WESEMEIER, 1996) e em macaco rhesus no Panamá (GARDINER, 1998). Em ambos os casos, o diagnóstico foi estabelecido pelo estudo histopatológico. Não são conhecidos nestes países quaisquer dados adicionais sobre a enfermidade e seu agente (Tabela 1).

Na América Latina, os registros de citauxzoonose felina foram realizados no Brasil em leões (PEIXOTO *et al.*, 1999), em onça pintada (SOARES *et al.*, 1999a) em gato-do-mato pequeno (SOARES *et al.*, 1999b) e experimentalmente em gatos domésticos (SCOFIELD *et al.*, 1999; SOARES, 2002); todos no Estado do Rio de Janeiro.

2.3.9. Potencial zoonótico

Diversas espécies de *Babesia* têm sido descritas infectando e determinando doença em seres humanos e entre elas *Babesia divergens*, *B. bovis*, *B. microti*, *B. canis*, *B. rodhaini* e *B. equi* (TELFORD III *et al.*, 1993; ESKOW *et al.*, 1999). Além disso, existem cinco espécies descritas, e outras ainda não-nominadas, em primatas não-humanos, com potencial zoonótico (TELFORD III *et al.*, 1993; BRONSDON *et al.*, 1999; ESKOW *et al.*, 1999). Um outro Piroplasmida, descrito em macacos, *Entopolypoides macaci*, também infecta humanos (TELFORD III *et al.*, 1993; BRONSDON *et al.*, 1999).

Curiosamente, as principais espécies de *Babesia* que infectam humanos, *B. microti*, *B. rodhaini* e *B. equi*, possuem uma relação molecular e filogenética

extremamente estreita com *C. felis* (ALLSOPP *et al.*, 1994; BRONSDON *et al.*, 1999; KJEMTRUP *et al.*, 2000b).

O potencial zoonótico de *C. felis* e outras espécies do gênero *Cytauxzoon* não é conhecido, no entanto, pelo fato de ter sido diagnosticada infecção natural e fatal por *C. felis simile* em macaco rhesus (GARDINER, 1998) e, por outras características biológicas e moleculares, não se pode descartar a possibilidade deste hematozoário infectar humanos.

3. CAPÍTULO I

Caracterizações morfológica e morfométrica de formas eritrocíticas de
Cytauxzoon felis simile

Resumo

Aspectos morfológico e morfométrico foram descritos para trofozoítos eritrocíticos de dois isolados brasileiros de *Cytauxzoon felis simile*, um obtido a partir de onça pintada (*Panthera onca*) e outro a partir de gato-do-mato pequeno (*Felis tigrina* = *Leopardus tigrinum*). Gatos doméstico, três para cada isolado, foram inoculados para a obtenção das formas parasitárias. Foram mensurados o diâmetro maior (DM), o diâmetro menor (dm) e o índice morfométrico (IM = dm/DM) de cada tipo de forma parasitária. Foram analisado o total de 1.605 trofozoítos. Os tipos morfológicos puntiforme ($1,80 \pm 0,24 \times 1,60 \pm 0,19 \mu\text{m}$), piriforme ($2,32 \pm 0,60 \times 1,73 \pm 0,32 \mu\text{m}$), anel de rubi ($2,21 \pm 0,34 \times 1,86 \pm 0,29 \mu\text{m}$), ovóide ($2,18 \pm 0,36 \times 1,94 \pm 0,35 \mu\text{m}$), alongada ($2,45 \pm 0,34 \times 1,76 \pm 0,29 \mu\text{m}$) e tétrade ($1,80 \pm 0,10 \times 1,56 \pm 0,09 \mu\text{m}$) foram observados. Houveram os predomínios dos tipos morfológicos ovóide e anel-de-rubi, e ambos os isolados são pleomórfico. Os trofozoítos eritrocíticos de *C. felis simile* são similares aos reportados em *C. felis*, nos Estados Unidos da América, porém altamente pleomórficos.

Palavras chave: *Cytauxzoon felis simile*, morfologia, morfometria, trofozoítos, eritrocitos, pleomorfismo.

Abstract

The morphological and morphometric characteristics of the intraerythrocytic trophozoites of two Brazilian isolates of *Cytauxzoon felis simile* from jaguar (*Panthera onca*) and small wild cat (*Felis tigrina* = *Leopardus tigrinum*) were described. Domestic cats, three for each isolate, were inoculated to obtain the parasitic forms. The morphological parameters from the bigger diameter (BD), the smaller diameter (sd) and the morphometric index (MI = sd/BD) for each type of parasitic forms were measured. The total of 1,605 trophozoites were analysed. Point-shaped ($1.80 \pm 0.24 \times 1.60 \pm 0.19 \mu\text{m}$), pear-shaped ($2.32 \pm 0.60 \times 1.73 \pm 0.32 \mu\text{m}$), ring-shape ($2.21 \pm 0.34 \times 1.86 \pm 0.29 \mu\text{m}$), ovoid ($2.18 \pm 0.36 \times 1.94 \pm 0.35 \mu\text{m}$), elongated ($2.45 \pm 0.34 \times 1.76 \pm 0.29 \mu\text{m}$) and tetrad forms ($1.80 \pm 0.10 \times 1.56 \pm 0.09 \mu\text{m}$) were showed. The ovoid and ring-shaped morphological types were predominant and both isolates were characterized as pleomorphic. *C. felis simile* erythrocytic trophozoites are similar to described for *Cytauxzoon felis* in the United States of America, however highly pleomorphic.

Key words: *Cytauxzoon felis simile*, morphology, morphometry, trophozoites, erythrocytes, pleomorphism.

3.1. Introdução

A citauxzoonose é uma hemoparasitose determinada por protozoários do gênero *Cytauxzoon* Neitz & Thomas, 1948 com as espécies *Cytauxzoon silvicaprae*, *Cytauxzoon strepsicerosi* e *Cytauxzoon taurotragi* acometendo ruminantes domésticos e silvestres no continente africano, e a espécie *Cytauxzoon felis* parasitando felídeos, principalmente, nos Estados Unidos da América (EUA) (NEITZ, 1957; WAGNER, 1976; KIER *et al.*, 1982a; 1987; MEHLHORN *et al.*, 1994; UILENBERG, 1995).

A partir do primeiro relato de cytauxzoonose felina descrita por Wagner em 1976, em gatos domésticos provenientes de zonas rurais do Sudoeste do Estado de Missouri, este Theileriidae vem sendo diagnosticado em outras regiões dos EUA e outros países, como na Alemanha (JAKOB & WESEMEIER, 1996) e no Brasil (PEIXOTO *et al.*, 1999; SOARES, 2002). Sua ocorrência esporádica e fatal em gatos domésticos sugere que estes animais sejam hospedeiros acidentais (BLOUIN *et al.*, 1984; KOCAN *et al.*, 1992; SCOFIELD *et al.*, 1999; SOARES, 2002).

Na América do Norte, os gatos domésticos apresentam um quadro clínico de infecção superaguda ou aguda com anemia hemolítica, severa letargia, paresias generalizadas, usualmente acompanhadas por febre alta, apatia, icterícia e ocasionalmente dispnéia (HOOVER *et al.*, 1994; KIER *et al.*, 1987). No entanto, no Brasil, estudos experimentais, com *Cytauxzoon felis simile*, revelaram que a citauxzoonose em gatos doméstico cursa de forma crônica e branda (SCOFIELD *et al.*, 1999; SOARES, 2002).

Infecções naturais em gatos domésticos pelo vetor infectado, têm sido reportadas como fatais, ocorrendo o óbito durante as primeiras 24 - 48 horas após o início dos sinais clínicos, embora, em alguns animais o óbito ocorra após uma semana (WALKER *et al.*, 1995). KIER *et al.* (1982) e GLENN *et al.* (1983) demonstraram que lincos vermelhos da América do Norte são os reservatórios naturais de *C. felis*, apresentando geralmente uma infecção subclínica, raramente fatal (MacWILLIAMS, 1987; GARNER *et al.*, 1996). Estas observações contrastam com o quadro clínico apresentado por gatos domésticos no Brasil (SOARES, 2002).

O ciclo biológico, muitos aspectos da morfologia, morfometria, ultraestrutura e fisiologia de *Cytauxzoon* spp; bem como, sua transmissão e a patogenia da

cytauxzoonose felina ainda não estão bem definidos (MacWILLIAMS, 1987). BLOUIN *et al.* (1984), transmitiram com sucesso, *C. felis* do lince vermelho para gatos domésticos, por *Dermacentor variabilis*, confirmando a associação entre *C. felis* e os dois hospedeiros felídeos.

O gênero *Cytauxzoon* Neitz & Thomas, 1948 foi assim nominado para referir-se a dezenas ou centenas de diminutos (0,5 a 0,75 μm) corpos circulares regularmente distribuídos e realizando esquizogonia no citoplasma de histiócitos. Este parasita se multiplica por fissão binária simples em eritrócitos e por esquizogonia em histiócitos (NEITZ & THOMAS, 1948; NEITZ, 1956; 1957; KOKAN *et al.*, 1992). *C. felis* foi originalmente descrito pela observação de trofozoítas intraeritrocíticos predominantemente em anel de rubi, alongadas ou puntiformes, medindo 1 a 1,2 μm (WAGNER, 1976). Estas formas possuem a cromatina nuclear basofílica e o citoplasma cora-se azul-hialino ou cora-se fracamente, e encontra-se freqüentemente no centro ou excêntrico quanto à localização no eritrócito (KIER *et al.*, 1987; SIMPSON *et al.*, 1985b; GLENN & STAIR, 1984). No entanto, muitas dúvidas existem e pouco se conhece sobre os detalhes morfológicos e morfométricos deste agente.

O presente estudo tem como objetivo realizar as caracterizações morfológica e morfométrica de formas eritrocíticas de *C. felis simile* em gatos domésticos, pela primeira vez, fora dos EUA.

3.2. Material e Métodos

3.2.1. Origem dos isolados de *Cytauxzoon felis simile*

Foram utilizados dois isolados de *C. felis simile*, um obtido a partir de onça pintada (*Panthera onca*) macho, com cinco anos, e outro a partir de gato-do mato-pequeno (*Felis tigrina* = *Leopardus tigrinum*) macho, com quatro anos, ambos cativos em um Zoológico no Município de Volta Redonda (altitude = 390m, latitude sul = 22° 31' 23" e longitude oeste = 44° 06' 15") (CIDE, 1997), Estado do Rio de Janeiro (SOARES, 2002).

3.2.2. Multiplicação dos isolados

Seis gatos doméstico (*Felis catus*), três para cada isolado, com idade entre seis meses e um ano, foram inoculados (0,5 ml) por via sub-cutânea com sangue coletado dos felinos silvestres doadores, conforme descrito por SOARES (2002). Esses animais foram doados pelo Centro de Controle de Zoonoses do Município do Rio de Janeiro, Estado do Rio de Janeiro.

3.2.3. Acompanhamento experimental

Os animais foram mantidos em ambiente isolado, segundo recomendações do Serviço de Sanidade Animal / Delegacia Federal de Agricultura/RJ – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, no biotério do Laboratório de Doenças Parasitárias – Projeto Sanidade Animal, Município de Seropédica (altitude = 26m, latitude sul = 22° 44' 38" e longitude oeste = 43° 42' 27") (CIDE, 1997), Estado do Rio de Janeiro. Esses foram alimentados com água e ração para gatos, *ad libitum* e foram acompanhados pelo período de um ano.

3.2.4. Coleta e processamento do material

Esfregaços foram confeccionados, a cada três dias, a partir de sangue obtido por venopunção de vasos marginais da orelha, dos seis animais e durante toda a fase experimental. Os esfregaços sangüíneos periféricos foram secos ao ar, fixados em álcool metílico absoluto e corados pelo Giemsa diluído em tampão sorensen pH 6,8 (LUBINSKY, 1960).

3.2.5. Análises microscópicas morfológica e morfométrica

Para as avaliações morfológica e morfométrica das formas parasitárias eritrocíticas de *C. felis simile*, toda a extensão do esfregaço sangüíneo foi analisada. Estas avaliações foram feitas em três momentos: no início da parasitemia, no meio do curso da infecção e no final do curso da infecção (quando do óbito natural ou sacrifício do animal), segundo metodologia descrita por SOARES (2002).

A análise morfológica descritiva foi realizada com o auxílio de um microscópio fotônico (Leitz Wetzalar – Dialux 20 EB) sob objetiva de imersão (100 X). Para a análise morfométrica, acoplou-se a este microscópio uma ocular micrométrica (Wild-pZo), com aumento de 15X. Foram mensurados o diâmetro maior (DM), o diâmetro menor (dm) e o índice morfométrico ($IM = dm/DM$) de cada forma parasitária.

3.2.6. Fotomicrografias

As fotomicrografias das formas parasitárias eritrocíticas de *C. felis simile* foram realizadas com o auxílio de uma câmara fotográfica acoplada ao microscópio óptico fotônico (Polarizing microscopes, Zeiss Jenapol) com ocular de 10x e objetiva 100x. Utilizou-se filme para fotos coloridas em papel (Ultra Gold – asa 100, Kodak).

3.2.7. Análises estatística e gráfica

Para a avaliação quantitativa dos dados experimentais foram utilizados o método de análise da variância (ANOVA) e o teste de Tukey para a análise de médias, com intervalo de confiança de 5% (ZAR, 1999). Foram contrastados os parâmetros morfométricos relativos ao DM, o dm e o IM das formas eritrocíticas de *C. felis simile* entre os animais de cada isolado, e a comparação entre os dois isolados.

Utilizou-se o programa computacional Microsoft Excel™ (Microsoft) para a análise para a montagem de planilhas de dados e o tratamento gráfico dos dados.

3.3. Resultados

3.3.1. Caracterizações morfológica e morfométrica

A caracterização de 1.605 trofozoítos de *C. felis simile*, nos seis gatos domésticos (*Felis catus*) inoculados experimentalmente com dois isolados (três para cada isolado), possibilitou as seguintes descrições, morfológicas e morfométricas, para os tipos parasitários intraeritrocíticos:

Puntiforme: apresenta cromatina nuclear em forma de ponto, citoplasma pouco evidente e mede $1,80 \pm 0,24 \times 1,60 \pm 0,19 \mu\text{m}$ (Fig. 2 A, B e C).

Piriforme: apresenta formato de pêra com uma extremidade afilada e a outra romba onde localiza-se o núcleo, e mede $2,32 \pm 0,60 \times 1,73 \pm 0,32 \mu\text{m}$ (Fig. 3 A, B e C).

Anel de rubi: possui cromatina nuclear arredondada e bem proeminente em um dos polos do parasito, citoplasma anelar bem evidente, e mede $2,21 \pm 0,34 \times 1,86 \pm 0,29 \mu\text{m}$ (Fig. 3 A, B e C).

Ovóide: possui cromatina nuclear condensada em formato de vírgula ou arredondada, citoplasma hialino bem definido, e mede $2,18 \pm 0,36 \times 1,94 \pm 0,35 \mu\text{m}$ (Fig. 4 A, B e C).

Alongada: apresenta núcleo condensado e região citoplasmática extensa quando comparada com as demais formas, e mede $2,45 \pm 0,34 \times 1,76 \pm 0,29 \mu\text{m}$ (Fig. 5 A, B e C).

Tétrade: semelhante à cruz-de-Malta, resulta de divisão binária, observando-se quatro trofozoítas semelhantes a pequenas formas piriformes com cromatina nuclear diminuta podendo estar localizada tanto na extremidade afilada quanto na extremidade romba; possui o citoplasma pouco evidente, e mede $1,80 \pm 0,10 \times 1,56 \pm 0,09 \mu\text{m}$ (Fig. 6 A, B e C).

A caracterização morfológica de todos os trofozoítas de *C. felis simile*, em ambos isolados, revelou o predomínio das formas dos tipos ovóide e em anel-de-rubi, na avaliação da média geral de um ano de análise (Fig. 8 e 9).

Nos três animais inoculados com o isolado obtido a partir de onça pintada (*P. onca*), pôde-se observar o predomínio das formas dos tipos ovóide e em anel-de-rubi em todas as três fases analisadas (Fig. 8). A mensuração média do agente foi de $1,91 \pm 0,32 \times 1,53 \pm 0,26 \mu\text{m}$ e $\text{IM} = 0,79 \pm 0,08$, com variação métrica de $1,56 \times 1,19 \mu\text{m}$ com $\text{IM} = 0,66$

(mínima) até 2,52 x 2,05 μ m com IM = 0,90 (máxima) (Tab. 3). Nos animais inoculados com isolado de gato-do-mato pequeno (*F. tigrina* = *Leopardus tigrinum*), na primeira fase houve o predomínio das formas dos tipos ovóide e em anel-de-rubi, e na segunda e terceira fase as formas ovóide, anel-de-rubi e alongada predominaram (Fig. 9). A mensuração média do agente foi de 2,34 \pm 0,36 x 2,00 \pm 0,28 μ m e IM = 0,84 \pm 0,07, com variação métrica de 1,90 x 1,62 μ m com IM= 0,73 (mínima), até 2,87 x 2,37 μ m com IM = 0,93 (máxima) (Tab. 4).

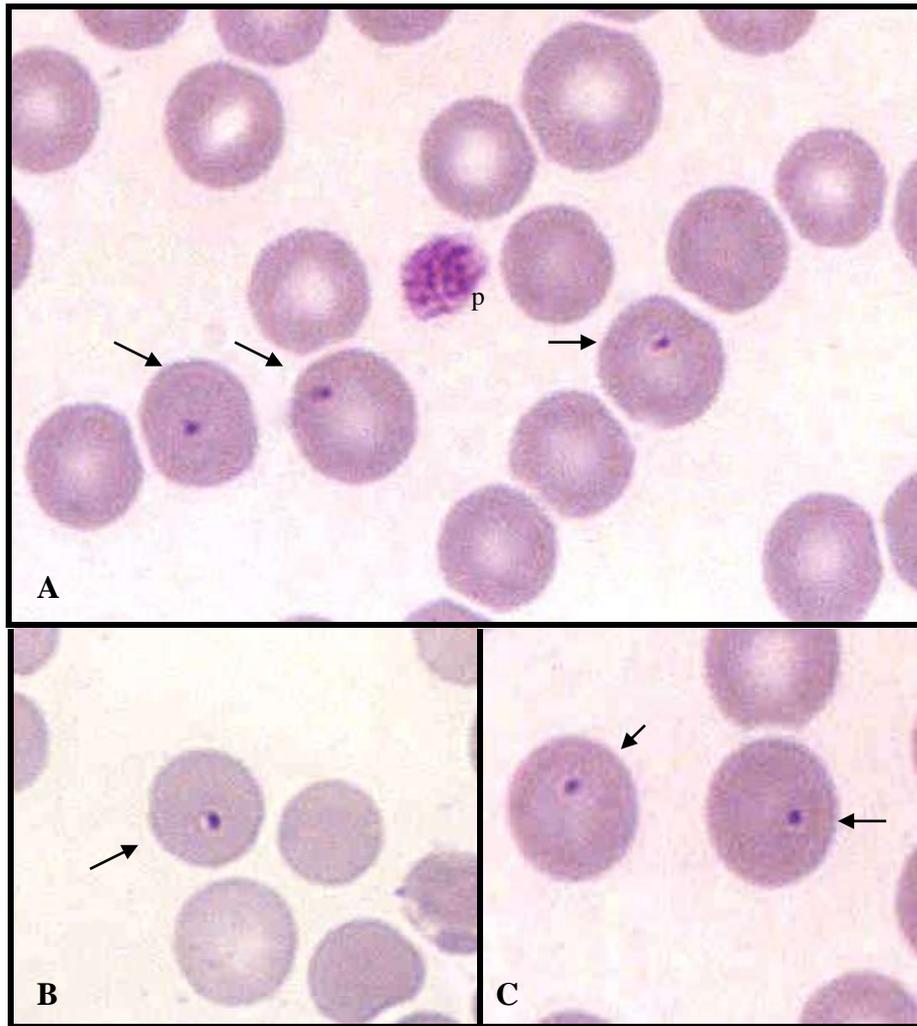


Fig.3. *Cytauxzoon felis simile*. **A, B, C**, Eritrócitos parasitados (→) por formas puntiformes apresentando cromatina nuclear em forma de ponto e citoplasma claro, porém bem delimitado. **A**, Presença de plaquetas (p). Corados pelo método Giemsa (1.000x).

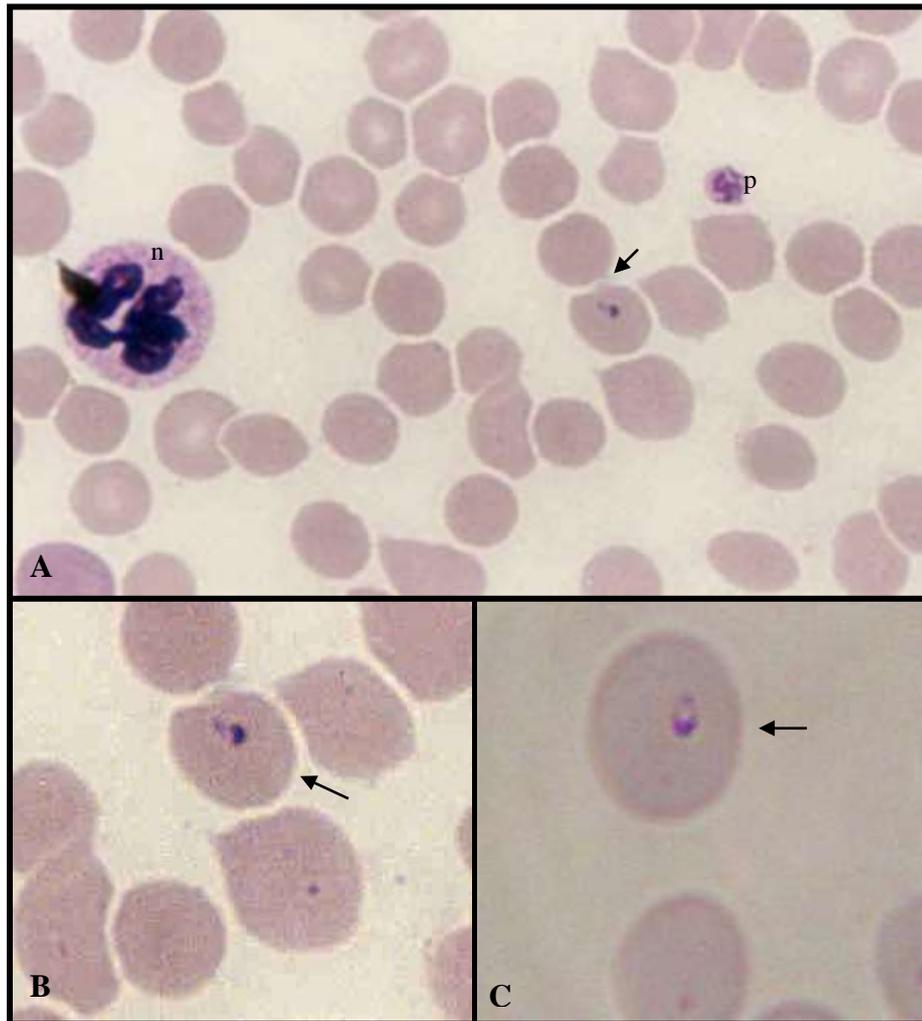


Fig. 4. *Cytauxzoon felis simile*. **A**, Eritrócito parasitado (→) por uma forma piriforme com uma extremidade afilada e a outra romba onde localiza-se o núcleo; presença de neutrófilo (n) e plaqueta (p). **B**, Forma piriforme presente na figura **A** com maior aproximação (→). **C**, Forma piriforme parasitando eritrócito (→). Corados pelo método Giemsa (1.000x)

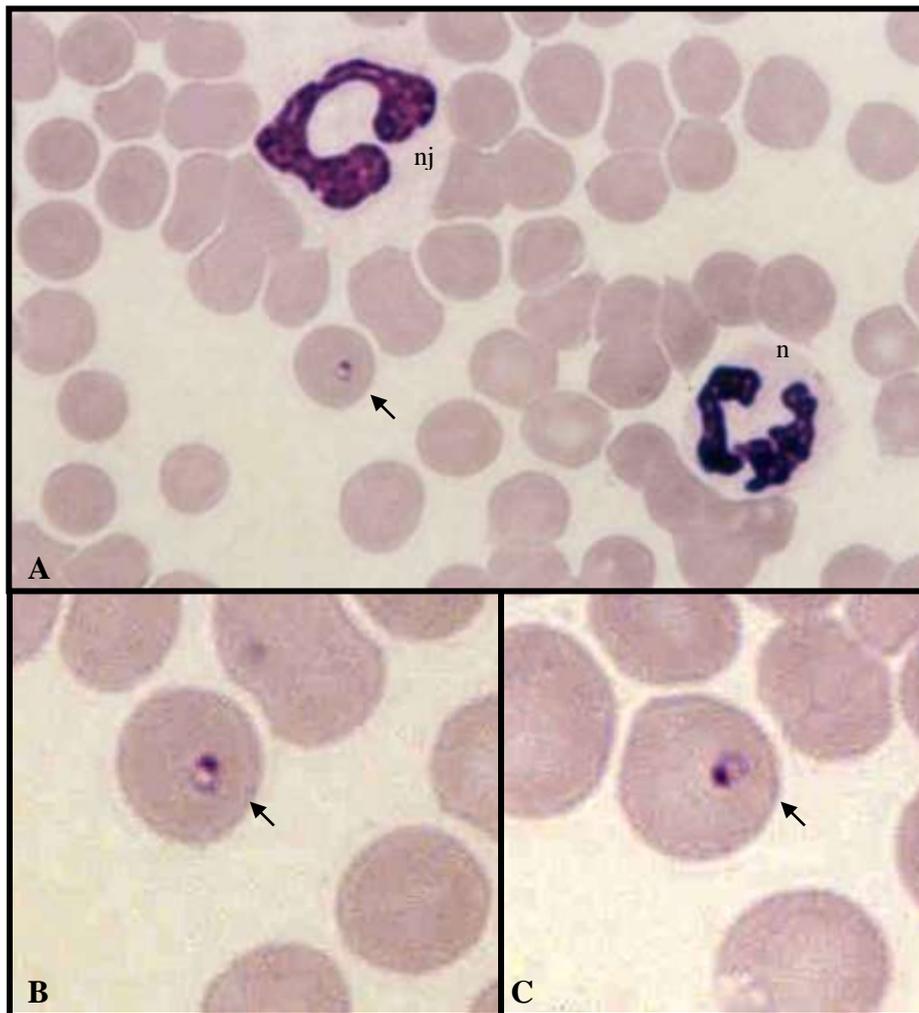


Fig. 5. *Cytauxzoon felis simile*. **A**, Eritrócito parasitado (→) por forma em anel de rubi com cromatina nuclear arredondada, bem proeminente em um dos pólos do parasito e citoplasma anelar bem evidente; presença de um neutrófilo jovem (nj) e um neutrófilo maduro (n). **B, C**, Formas em anel de rubi infectando eritrócitos em maior aproximação (→). Corados pelo método Giemsa (1.000x).

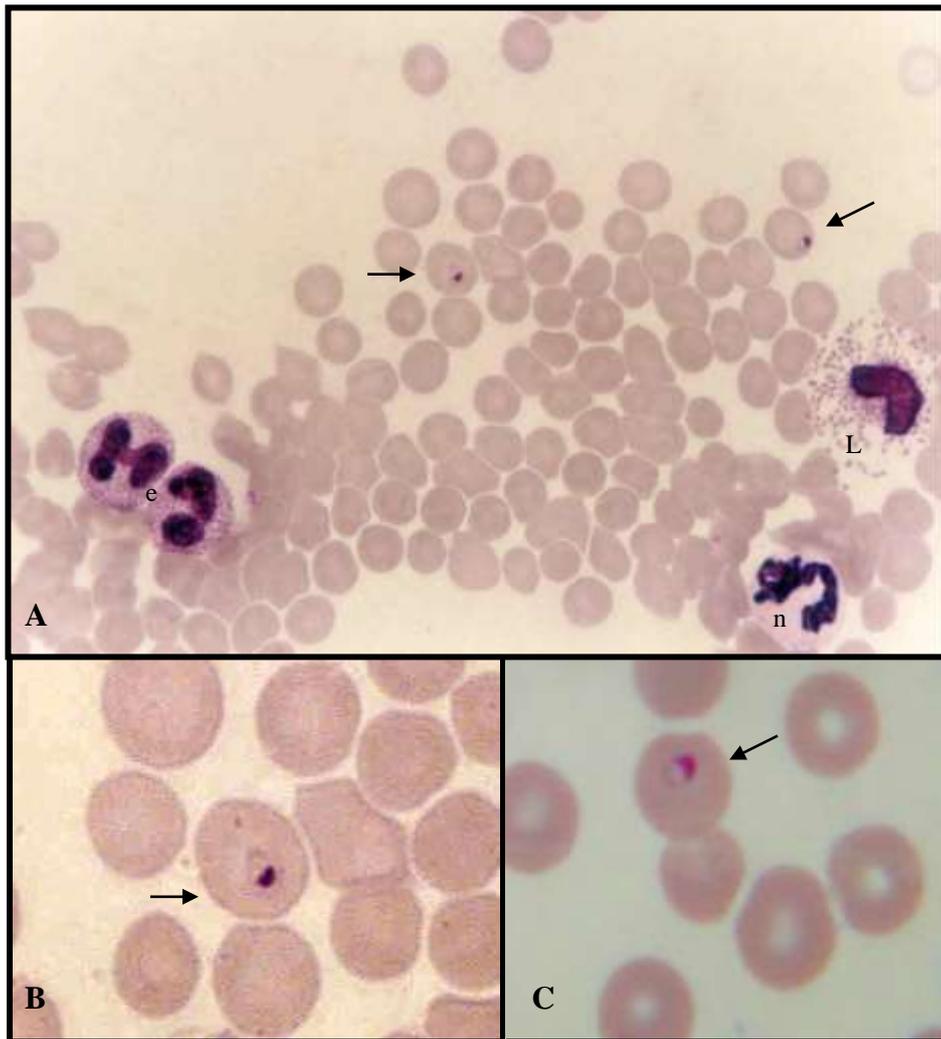


Fig. 6. *Cytauxzoon felis simile*. **A**, Eritrócitos parasitados (→) por formas ovóides com cromatina nuclear condensada em formato de meia lua e citoplasma claro bem definido; presença de eosinófilos (e), neutrófilo (n) e leucócito em degeneração (L). **B**, **C**, Formas ovóides, em maior aproximação, infectando eritrócitos (→). Corados pelo método Giemsa (1.000x).

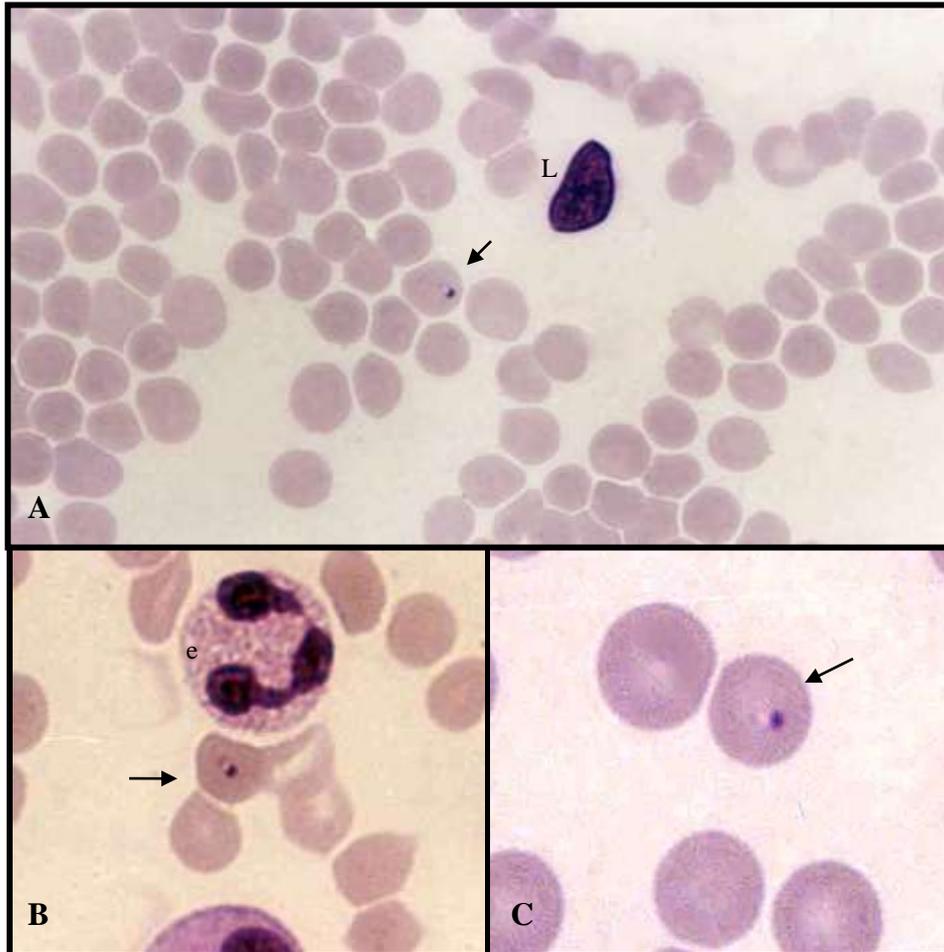


Fig. 7. *Cytauxzoon felis simile*. **A**, Eritrócito infectado (→) por uma forma alongada com núcleo hipercromático e citoplasma extenso; presença de leucócito em degeneração (L). **B**, Forma alongada parasitando eritrócito (→) localizado abaixo de um eosinófilo (e). **C**, Eritrócito infectado (→) por uma forma alongada. Corados pelo método Giemsa (1.000x).

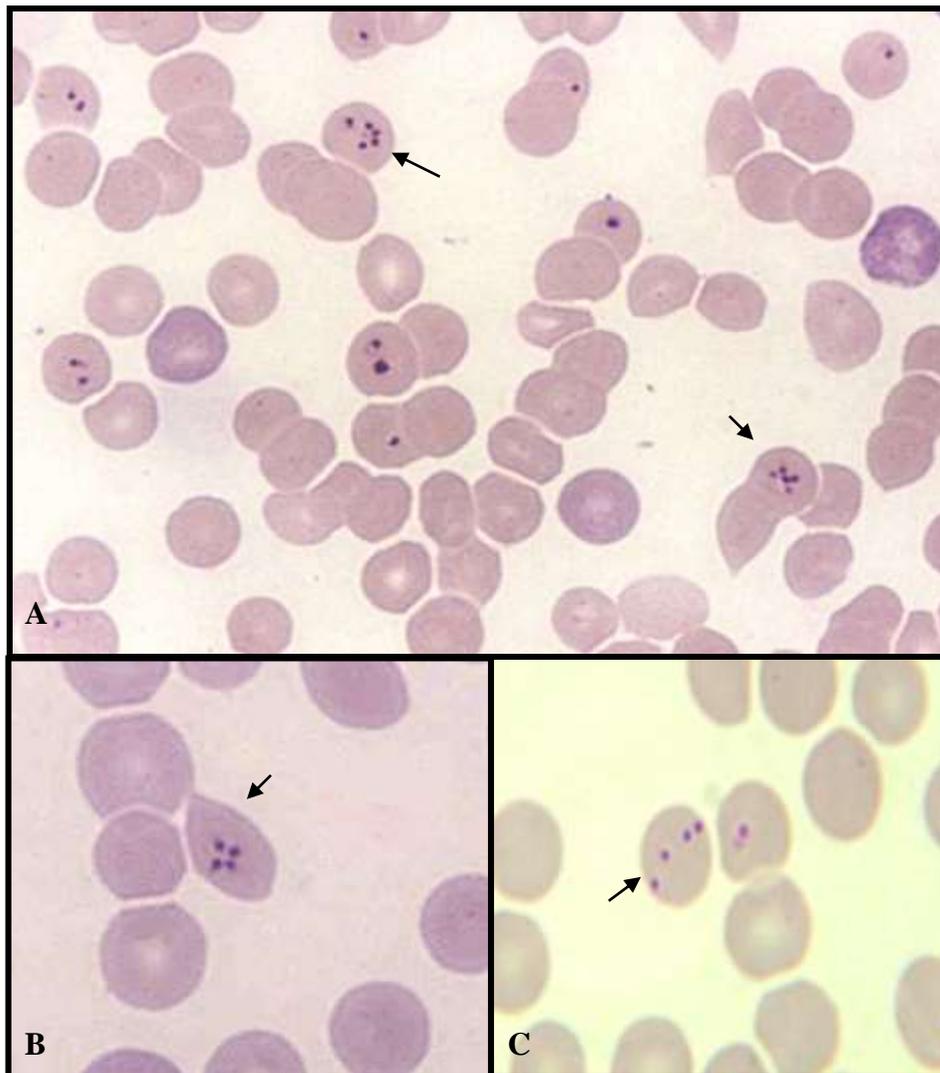


Fig. 8. *Cytauxzoon felis simile*. **A**, Formas em tétrede semelhantes à Cruz-de-Malta (→) e presença de outros tipos morfológicos infectando eritrócitos. **B**, Eritrócito parasitado por uma forma em tétrede, resultante de divisão binária; observam-se quatro trofozoítas semelhantes a pequenas formas piriformes com cromatina nuclear diminuta localizada em uma das extremidades (→) . **C**, Forma em tétrede desarmada com quatro trofozoítas localizados na região mediana do eritrócito (→). Corados pelo método Giemsa (1.000x).

3.3.2. Análises estatística e gráfica

A análise estatística dos 790 trofozoítos provenientes do isolado da onça pintada, revelou diferença significativa ($P < 0,05$) quanto ao dm, para o tipo morfológico puntiforme na mensuração da primeira fase com as demais, e quanto ao IM da terceira fase e as demais. Quanto aos DM e dm, houve diferença para a forma ovóide da primeira para as demais fases. Para a forma alongada houve diferença entre o IM da terceira fase e as demais. A análise entre os tipos morfológicos da segunda fase revelou diferença ($P < 0,05$) quanto ao dm das formas puntiforme e ovóide, e as demais formas. Houve diferença significativa ($P < 0,05$) quanto ao DM da forma ovóide e as demais formas. Na terceira fase o dm da forma puntiforme diferiu de todas as formas, exceto ovóide; e o seu IM só não diferiu da forma alongada. Para a forma ovóide o DM diferiu de todas as formas ($P < 0,05$); o dm só não diferiu da forma puntiforme e, o IM diferiu das formas puntiforme e alongada ($P < 0,05$). Houve diferença significativa ($P < 0,05$) quanto ao IM da forma alongada e as demais, exceto para a forma puntiforme (Tab. 3).

A análise estatística dos 815 trofozoítos provenientes do isolado do gato-do-mato pequeno, revelou diferença significativa ($P < 0,05$), quanto ao dm, para o tipo morfológico em anel-de-rubi entre a primeira e a segunda fase; e no DM da terceira. Para o tipo morfológico ovóide houve diferença ($P < 0,05$) para DM e dm entre a primeira fase e as demais. Para a forma alongada houve diferença ($P < 0,05$) entre o dm da terceira fase e as demais. A análise entre os tipos morfológicos revelou diferença ($P < 0,05$), quanto ao dm e DM da forma puntiforme e as demais; e seu IM só não diferiu da forma tétrade. Quanto ao DM da forma anel-de-rubi, houve diferença ($P < 0,05$) entre todas as formas exceto da ovóide; e quanto ao dm diferiu das formas puntiforme, piriforme ovóide e tétrade, e o IM só não diferiu das formas alongada e tétrade. A forma ovóide só não diferiu quanto ao DM da forma alongada; o dm diferiu de todas as formas e o IM só não diferiu da tétrade. Quanto ao DM da forma alongada, houve diferença ($P < 0,05$) entre as formas puntiforme, anel-de-rubi e tétrade; quanto ao dm houve diferença entre todas as formas; o IM só não diferiu da forma em anel. O DM e o dm da forma em tétrade diferiu de todas as outras e o IM só diferiu da piriforme (Tab. 4).

A análise estatística entre as médias dos isolados estudados demonstrou diferença significativa entre DM, dm e IM dos trofozoítos da onça quando comparado aos do isolado do gato-do-mato (Tab. 5). Esta observação indica pleomorfismo entre os isolados estudados.

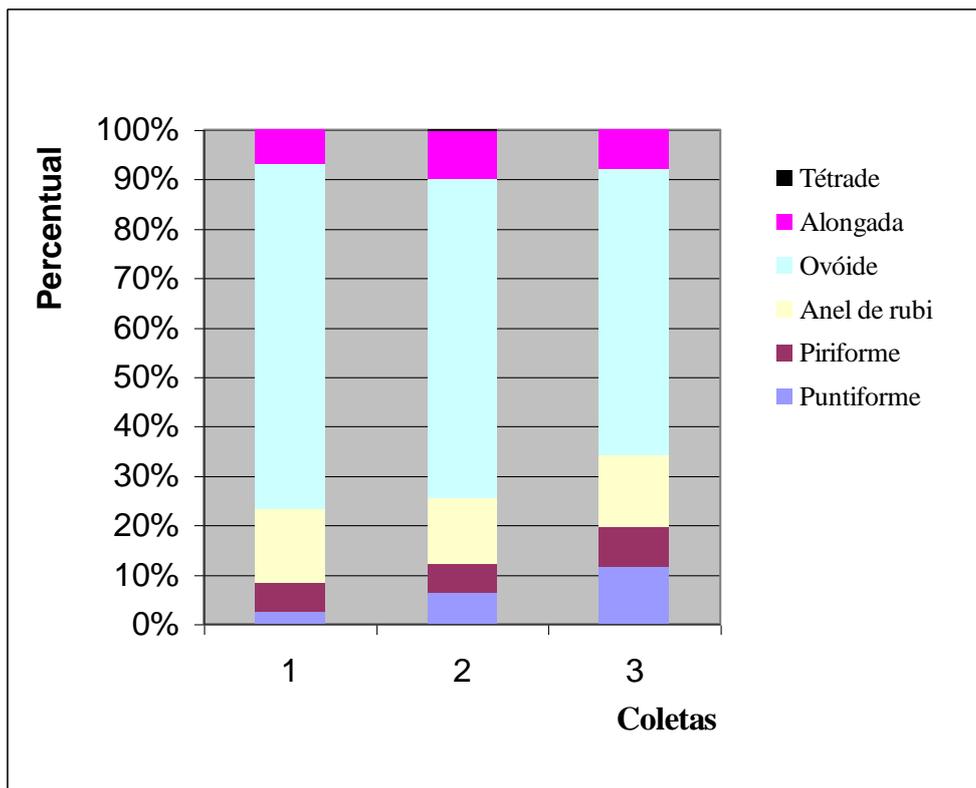


Fig. 9. Distribuição percentual dos tipos morfológicos eritrocíticos de *Cytauxzoon felis simile* em gatos domésticos infectados experimentalmente com isolado de onça pintada (*Panthera onca*). Análise da média geral da dinâmica de infecção de três gatos positivos durante o período experimental, em diferentes fases.

Tab. 3. Caracterização morfológica e morfométrica de *Cytauxzoon felis simile* em gatos domésticos (n = 3) infectados com isolado de *Panthera onca* naturalmente parasitado. Análise de diferentes tipos morfológicos intraeritrocítico em três coletas.

		Tipos morfológicos (790) [†]											
Coleta	Variáveis	Puntiforme		Piriforme		Anel-de-rubi		Ovóide		Alongada		Tétrade	
		(DMxDM) ^{**} (µm)	IM ^{***}	(DMxDM) ^{**} (µm)	IM ^{***}	(DMxDM) ^{**} (µm)	IM ^{***}	(DMxDM) ^{**} (µm)	IM ^{***}	(DMxDM) ^{**} (µm)	IM ^{***}	(DMxDM) ^{**} (µm)	IM ^{***}
1	Valores ^{****}	1,32 ^a ± 0,31 x 1,50 ^a ± 0,08	0,86 ^a ± 0,11	2,32 ^a ± 0,40 x 1,67 ^a ± 0,32	0,71 ^a ± 0,05	2,05 ^a ± 0,40 x 1,68 ^a ± 0,29	0,82 ^a ± 0,07	2,06 ^a ± 0,41 x 1,81 ^a ± 0,41	0,86 ^a ± 0,10	2,30 ^a ± 0,24 x 1,66 ^a ± 0,27	0,71 ^a ± 0,07	-	-
	Mínimo	1,60 x 1,47	0,81	1,88 x 1,33	0,65	1,63 x 1,34	0,72	1,33 x 1,14	0,55	2,10 x 1,34	0,62	-	-
	Máximo	1,95 x 1,56	0,92	2,85 x 2,21	0,80	2,82 x 2,31	0,91	3,09 x 2,86	1,00	2,65 x 2,03	0,79	-	-
	Total de formas	6		15		37		175		17		-	-
	Valores ^{****}	1,48 ^a ± 0,25 x 1,22 ^b ± 0,21	0,83 ^a ± 0,10	2,01 ^a ± 0,31 x 1,49 ^a ± 0,24	0,74 ^a ± 0,10	1,90 ^a ± 0,33 x 1,48 ^a ± 0,27	0,78 ^a ± 0,08	1,93 ^b ± 0,35 x 1,67 ^b ± 0,33	0,86 ^a ± 0,08	2,03 ^a ± 0,28 x 1,26 ^a ± 0,34	0,62 ^a ± 0,10	1,82 ± 0,11 x 1,67 ± 0,12	0,92 ± 0,08
Mínimo	1,15 x 0,96	0,68	1,62 x 1,22	0,62	1,53 x 1,27	0,62	1,37 x 1,11	0,67	1,66 x 0,94	0,48	1,67 x 1,50	0,82	
Máximo	1,88 x 1,55	0,94	2,38 x 1,85	0,89	2,74 x 2,13	0,90	2,95 x 2,56	1,00	2,46 x 1,76	0,77	1,92 x 1,75	1,00	
Total de formas	19		18		37		196		29		1		
3	Valores ^{****}	1,54 ^a ± 0,29 x 1,40 ^b ± 0,29	0,91 ^b ± 0,05	1,93 ^a ± 0,38 x 1,31 ^a ± 0,24	0,69 ^a ± 0,11	1,92 ^a ± 0,32 x 1,54 ^a ± 0,28	0,79 ^a ± 0,07	1,82 ^b ± 0,33 x 1,59 ^b ± 0,31	0,88 ^a ± 0,08	2,16 ^a ± 0,31 x 1,49 ^a ± 0,24	0,69 ^b ± 0,03	-	-
	Mínimo	1,21 x 1,10	0,82	1,47 x 0,78	0,42	1,55 x 1,25	0,66	1,24 x 1,01	0,71	1,83 x 1,24	0,64	-	-
	Máximo	2,02 x 1,90	0,99	2,44 x 1,65	0,86	2,62 x 2,19	0,89	2,81 x 2,56	1,00	2,56 x 1,88	0,73	-	-
	Total de formas	28		19		35		139		19		-	-
	Valores ^{****}	1,59 ^A ± 0,26 x 1,37 ^A ± 0,19	0,87 ^A ± 0,08	2,07 ^B ± 0,37 x 1,48 ^B ± 0,27	0,72 ^{A,B} ± 0,09	1,96 ^{B,C} ± 0,35 x 1,57 ^{B,C} ± 0,28	0,80 ^{A,B,C} ± 0,08	1,94 ^{B,C,D} ± 0,36 x 1,69 ^D ± 0,35	0,86 ^{A,B} ± 0,09	2,16 ^A ± 0,28 x 1,47 ^{B,C,E} ± 0,28	0,67 ^E ± 0,05	1,82 ± 0,11 x 1,67 ± 0,12	0,92 ± 0,08
Mínimo	1,32 x 1,17	0,77	1,61 x 1,14	0,62	1,57 x 1,24	0,66	1,31 x 1,09	0,64	1,87 x 1,14	0,61	1,67 x 1,50	0,82	
Máximo	1,95 x 1,67	0,95	2,55 x 1,90	0,86	2,73 x 2,21	0,90	2,92 x 2,66	1,00	2,56 x 1,89	0,76	1,92 x 1,75	1,00	
Total de formas	53		52		109		510		65				

* Número total de formas analisadas.

** Diâmetro maior (DM) e diâmetro menor (dm). Valores em micrômetro (µm).

*** Índice morfométrico (IM = dm/DM).

**** Valores em média ± desvio padrão.

Letras minúsculas diferentes dentro da mesma coluna indicam diferença estatística (P < 0,05).

Letras maiúsculas diferentes dentro da mesma linha indicam diferença estatística (P < 0,05).

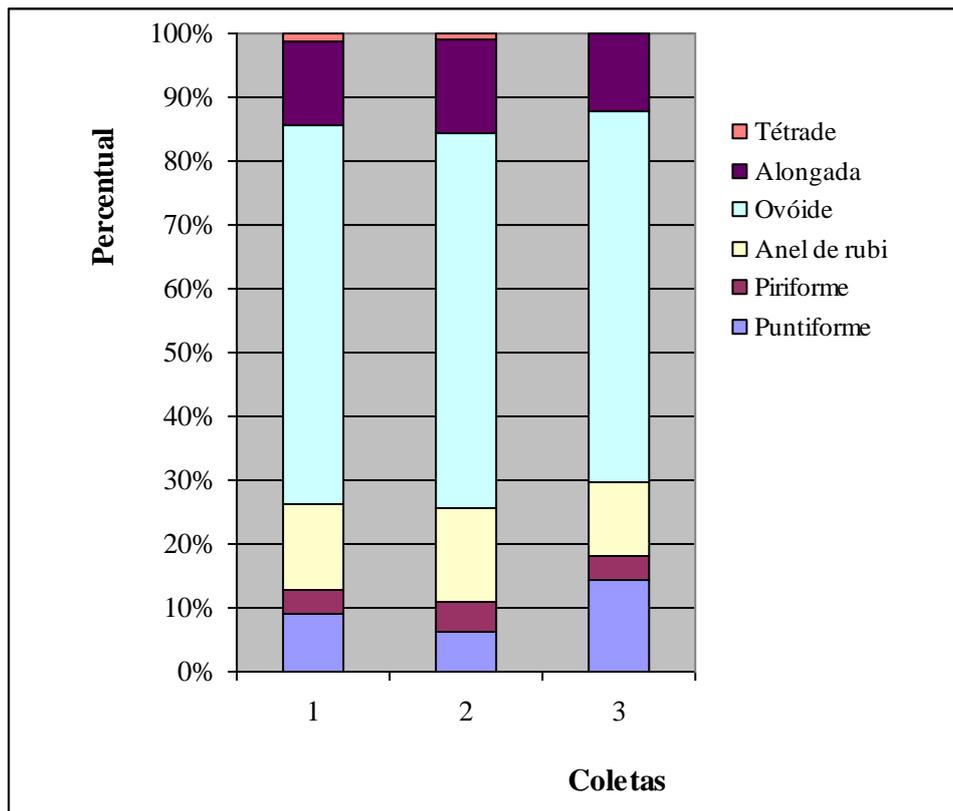


Fig. 10. Distribuição percentual dos tipos morfológicos eritrocíticos de *Cytosuxzoon felis simile* em gatos domésticos infectados experimentalmente com isolado de gato-do-mato pequeno (*Leopardus tigrinus*). Análise da média geral da dinâmica de infecção de três gatos positivos durante o período experimental, em diferentes fases.

Tab. 4. Caracterização morfológica e morfométrica de *Cytauxzoon felis simile* em gatos domésticos (n = 3) inoculados com isolado de *Felis tigrina* naturalmente parasitado.

Análise de diferentes tipos morfológicos intraeritrocítico em três coletas.

		Tipos morfológicos (815)*												
Coleta	Variáveis	Puntiforme		Piriforme		Anel-de-rubi		Ovóide		Alongada		Tétrade		
		(DMxDM)**(µm)	IM***	(DMxDM)**(µm)	IM***	(DMxDM)**(µm)	IM***	(DMxDM)**(µm)	IM***	(DMxDM)**(µm)	IM***	(DMxDM)**(µm)	IM***	
1	Valores****	1,85 ^a ± 0,19 x 1,63 ^a ± 0,19	0,88 ^a ± 0,06	2,28 ^a ± 0,43 x 2,23 ^a ± 0,18	0,75 ^a ± 0,11	2,24 ^a ± 0,37 x 1,88 ^a ± 0,27	0,85 ^a ± 0,07	2,28 ^a ± 0,34 x 2,03 ^a ± 0,31	0,89 ^a ± 0,06	2,58 ^a ± 0,43 x 1,87 ^a ± 0,26	0,73 ^a ± 0,08	1,63 ^a ± 0,09 x 1,33 ^a ± 0,06	0,82 ^a ± 0,05	
	Mínimo	1,61 x 1,34	0,80	1,96 x 1,58	0,67	1,65 x 1,46	0,71	1,53 x 1,38	0,74	2,02 x 1,49	0,58	1,45 x 1,25	0,75	
	Máximo	2,25 x 1,90	0,97	2,59 x 1,87	0,82	2,91 x 1,99	0,97	3,06 x 2,72	1,00	3,56 x 2,35	0,88	1,72 x 1,43	0,87	
	Total de formas	27		11		41		178		39		4		
	Valores****	2,46 ^a ± 0,22 x 2,27 ^a ± 0,17	0,92 ^a ± 0,05	2,86 ^a ± 0,38 x 2,18 ^a ± 0,39	0,76 ^a ± 0,09	2,70 ^a ± 0,37 x 2,43 ^b ± 0,38	0,90 ^a ± 0,06	2,71 ^b ± 0,40 x 2,46 ^b ± 0,39	0,91 ^a ± 0,06	2,77 ^a ± 0,39 x 2,09 ^a ± 0,30	0,75 ^a ± 0,07	2,10 ^a ± 0,08 x 1,80 ^a ± 0,07	0,86 ^a ± 0,06	
2	Mínimo	2,20 x 2,05	0,85	2,44 x 1,67	0,66	2,20 x 2,18	0,76	1,88 x 1,77	0,77	2,16 x 1,61	0,59	1,96 x 1,73	0,78	
	Máximo	2,80 x 2,51	0,98	3,39 x 2,59	0,87	3,39 x 3,24	0,97	3,57 x 3,30	1,00	3,45 x 2,56	0,79	2,18 x 1,87	0,95	
	Total de formas	19		14		44		176		44		3		
	Valores****	1,73 ^a ± 0,25 x 1,61 ^a ± 0,23	0,93 ^a ± 0,05	2,56 ^a ± 1,01 x 2,04 ^a ± 0,48	0,82 ^a ± 0,17	2,19 ^b ± 0,26 x 1,91 ^{ab} ± 0,28	0,86 ^a ± 0,06	2,27 ^b ± 0,39 x 2,08 ^b ± 0,37	0,91 ^a ± 0,06	2,70 ^a ± 0,44 x 2,22 ^b x 0,42	0,77 ^a ± 0,09	- -	- -	
	Mínimo	1,46 x 1,34	0,85	2,25 x 1,87	0,74	1,73 x 1,52	0,78	1,55 x 1,42	0,73	2,30 x 1,84	0,65	-	-	
3	Máximo	1,96 x 1,84	0,98	3,06 x 2,23	0,89	2,72 x 2,39	0,97	3,03 x 2,75	1,00	3,27 x 2,77	0,85	-	-	
	Total de formas	31		8		25		125		26		-		
	Valores****	2,01 ^A ± 0,23 x 1,84 ^A ± 0,20	0,92 ^A ± 0,05	2,57 ^B ± 0,48 x 1,98 ^B ± 0,37	0,78 ^B ± 0,11	2,46 ^C ± 0,34 x 2,15 ^{B,C} ± 0,31	0,87 ^C ± 0,07	2,42 ^{C,D} ± 0,37 x 2,19 ^{B,D} ± 0,36	0,90 ^D ± 0,06	2,74 ^{B,D,E} ± 0,41 x 2,06 ^{B,C,E} ± 0,30	0,75 ^{C,E} ± 0,08	1,79 ^F ± 0,09 x 1,46 ^F ± 0,07	0,81 ^{A,C,D,E} ± 0,05	
	Média	Mínimo	1,75 x 1,58	0,84	2,22 x 1,71	0,71	1,95 x 1,71	0,75	1,64 x 1,52	0,72	2,16 x 1,65	0,62	1,67 x 1,38	0,75
	Máximo	2,34 x 2,08	0,97	2,88 x 2,23	0,86	3,09 x 2,73	0,98	3,22 x 2,93	1,00	3,42 x 2,51	0,84	1,88 x 1,56	0,88	
Total de formas	77		33		110		479		109		7			

* Número total de formas analisadas.

** Diâmetro maior (DM) e diâmetro menor (dm). Valores em micrômetro (µm).

*** Índice morfométrico (IM = dm/DM).

**** Valores em média ± desvio padrão.

Letras minúsculas diferentes dentro da mesma coluna indicam diferença estatística (P < 0,05).

Letras maiúsculas diferentes dentro da mesma linha indicam diferença estatística (P < 0,05).

Tab. 5. Caracterização morfométrica de formas intraeritrocíticas de *Cytauxzoon felis simile* em gatos domésticos. Análise da média geral, de cada coleta, entre dois isolados.

Isolado Onça - Média Geral (790)*								
Variáveis	Coleta 1		Coleta 2		Coleta 3		Média	
	(DMx _{dm})** (μm)	IM***	(DMx _{dm})** (μm)	IM***	(DMx _{dm})** (μm)	IM***	(DMx _{dm})** (μm)	IM***
Valores****	2,01 \pm 0,35 x 1,66 \pm 0,27	0,79 \pm 0,08	1,86 \pm 0,27 x 1,46 \pm 0,25	0,79 \pm 0,09	1,87 \pm 0,33 x 1,47 \pm 0,27	0,79 \pm 0,06	1,91 ^B \pm 0,32 x 1,53 ^B \pm 0,26	0,79 ^B \pm 0,08
Mínimo	1,71 x 1,32	0,67	1,50 x 1,17	0,65	1,46 x 1,08	0,65	1,56 x 1,19	0,66
Máximo	2,67 x 2,19	0,88	2,39 x 1,93	0,92	2,49 x 2,04	0,89	2,52 x 2,05	0,90
Isolado Gato-do-mato - Média Geral (815)*								
Variáveis	Coleta 1		Coleta 2		Coleta 3		Média	
	(DMx _{dm})** (μm)	IM***	(DMx _{dm})** (μm)	IM***	(DMx _{dm})** (μm)	IM***	(DMx _{dm})** (μm)	IM***
Valores****	2,14 \pm 0,31 x 1,83 \pm 0,21	0,82 \pm 0,07	2,60 \pm 0,31 x 2,20 \pm 0,28	0,85 \pm 0,06	2,29 \pm 0,47 x 1,97 \pm 0,36	0,86 \pm 0,09	2,34 ^A \pm 0,36 x 2,00 ^A \pm 0,28	0,84 ^A \pm 0,07
Mínimo	1,70 x 1,42	0,71	2,14 x 1,83	0,73	1,86 x 1,60	0,75	1,90 x 1,62	0,73
Máximo	2,68 x 2,04	0,92	3,13 x 2,68	0,93	2,81 x 2,40	0,94	2,87 x 2,37	0,93

* Número total de formas analisadas.

** Diâmetro maior (DM) e diâmetro menor (dm). Valores em micrômetro (μm).

*** Índice morfométrico (IM = dm/DM).

**** Valores em média \pm desvio padrão.

Letras diferentes indica diferença estatística ($P < 0,05$).

3.4. Discussão

O agente etiológico da doença fatal para gato doméstico, semelhante à citauxzoonose dos ungulados africanos foi inicialmente diagnosticado, nos EUA, baseado nos caracteres morfológicos e biológicos, especialmente das formas esquizogônicas, sendo tentativamente classificado como pertencente ao gênero *Cytauxzoon* Neitz & Thomas, 1948, família Theileriidae (WAGNER, 1976; WAGNER *et al.*, 1976; UILENBERG, 1995).

As espécies pertencentes aos gêneros *Cytauxzoon* e *Theileria* são caracterizados por apresentarem uma fase de ciclo biológico eritrocítica e uma fase esquizogônica não-eritrocítica, o que difere das espécies da família Babesiidae que apresentam somente uma fase eritrocítica (MEHLHORN & SCHEIN, 1984; KOCAN *et al.*, 1992; KAKOMA & MEHLHORN, 1994; MEHLHORN *et al.*, 1994). As formas eritrocíticas de parasitos desses gêneros, são similares àquelas apresentadas pelas pequenas babésias (*B. microti*, *B. equi*, *B. brasiliensis*, *B. rhodaini*), sendo muitas vezes indistinguíveis pela microscopia fotônica (GLENN *et al.*, 1982). No entanto, a caracterização morfológica e morfométrica dos theilerídeos demonstra que estes possuem peculiaridades próprias, como as verificadas no presente trabalho.

As formas eritrocíticas de *C. felis* encontradas em gatos domésticos naturalmente e/ou experimentalmente infectados, apresentam-se usualmente em um ou dois trofozoítos, eventualmente três ou quatro (tétrade ou em cruz-de-malta), podendo, ainda, ser ovais, arredondadas, anaplastomóides (= puntiforme), piriformes, em anel-de-rubi e alongadas. As formas arredondadas e em anel-de-rubi são, no entanto, descritas como as mais comuns (WAGNER, 1976; SIMPSON *et al.*, 1985b; KIER *et al.*, 1987; BUTT *et al.*, 1991; HOOVER *et al.*, 1994). Nas espécies *C. strepsicerosi* e *C. sylvicaprae*, que infectam ungulados silvestres e domésticos na África, as formas eritrocíticas apresentam-se ovóide (0,8-1,1µm por 1,5-2,0µm), forma em vírgula (0,5-0,9µm por 2,0-2,5µm) e arredondada (2,0-2,5µm) (NEITZ, 1956). Usualmente para *C. felis* a cromatina nuclear apresenta-se basofílica, em geral periférica, com citoplasma azul-hialino ou fracamente corado; as formas localizam-se geralmente no centro do eritrócito ou em posição excêntrica (WAGNER, 1976; GLENN & STAIR, 1984; SIMPSON *et al.*, 1985b; KIER *et al.*, 1987).

Cytauxzoon felis simile tem sido identificado também em eritrócitos de lince (KIER *et al.*, 1982a; GLENN *et al.*, 1983), guepardo (*Acinonyx jubatus*) (ZINKLE *et al.*, 1981), pantera da Flórida (*Felis concolor coryi*) (BUTT *et al.*, 1991), tigre de bengala (JAKOB & WESEMEIER, 1996), onça pintada (*P. onca*) e gato-do-mato pequeno (*F. tigrina*) (SOARES, 2002).

As variações morfológicas nos trofozoítos de *C. felis simile* observadas no presente trabalho comparados com as descrições acima são muito semelhantes e apresentam como tipos morfológicos predominantes as formas ovóide e anel de rubi. Estas devem ser consideradas importantes no diagnóstico hemoscópico da citauxzoonose felina no Brasil.

A diferença morfométrica verificada entre os isolados de *C. felis simile* pode ser decorrente de fenômenos biológicos inerentes ao processo de adaptação dos isolados em seus respectivos hospedeiros. Este fato é registrado em microrganismos, especialmente, protozoários, e muitas das vezes está relacionado à mecanismos de evasão do parasito às respostas imunológicas do hospedeiro (ALLSOPP *et al.*, 1994; BERENDT *et al.*, 1994; KAKOMA & MEHLHORN, 1994; MEHLHORN *et al.*, 1994), onde populações do mesmo patógeno podem ser formadas dentro, até mesmo, de um mesmo hospedeiro (COX, 1994; HOLDER, 1994; MEHLHORN & SCHEIN, 1984; SELL *et al.*, 1996). Como também, pode ocorrer fases limitadas do ciclo biológico do parasito, dentro de um hospedeiro, como foi descrito para a esquizogonia de *C. felis* (BLOUIN *et al.*, 1987).

4. CAPÍTULO II

Ultraestructura de formas eritrocíticas de *Cytauxzoon felis simile*

Resumo

Realizou-se um estudo por microscopia eletrônica de transmissão, de trofozoítos intraeritrocíticos de *Cytauxzoon felis simile*, em gatos domésticos experimentalmente infectados com um isolado brasileiro proveniente de onça pintada (*Panthera onca*). Formas parasitárias alongadas foram predominantes, observando-se também formas esféricas e em divisão. Os trofozoítos apresentaram membrana citoplasmática dupla; delgada, núcleo excêntrico, circundado por uma membrana dupla; mitocôndrias atípicas, não pregueadas, com dupla membrana e localizada no polo oposto ao núcleo, e vacúolos digestivos limitados por dupla membrana. Microtúbulos extranucleares, ribossomos, retículo endoplasmático e lisossomos foram observados dispersos pelo citoplasma do trofozoíto. Foram visualizados, citóstoma com dupla membrana e pregas citoplasmáticas interligando formas parasitárias durante o processo de divisão binária. Não foi verificado vacúolo parasitóforo nos eritrócitos parasitados por trofozoítos de *C. felis simile*.

Palavras chave: *Cytauxzoon felis simile*, trofozoítos, ultraestrutura, microscopia eletrônica de transmissão.

Abstract

A transmission electron microscopy study was carried out on *Cytauxzoon felis simile* erythrocytic trophozoites from domestic cats experimentally infected with a Brazilian isolate from jaguar (*Panthera onca*). Elongated parasitic forms were predominant, but spherical and in division forms were also seen. Trophozoites showed double cytoplasmic membrane, eccentric single nucleus surrounded by double membrane, non-plicated mitochondria with a double membrane and usually situated opposite to the nucleus, and double-walled food vacuole. Extra nuclear microtubules, ribosomes, endoplasmic reticulum and lysosomes are present dispersed in the cytoplasm. *C. felis simile* trophozoites have a cytostome with double membrane and cytoplasmic bridge between parasitic forms in division process. No parasitophorous vacuole was found in *C. felis simile* trophozoites parasitized erythrocytes.

Key words: *Cytauxzoon felis simile*, trophozoites, ultrastructure, transmission electron microscopy.

4.1. Introdução

A citauxzoonose felina é uma doença, aguda e fatal para gatos domésticos nos Estados Unidos da América (WAGNER, 1976; 1980; KIER et al., 1982a; 1987), e crônica e branda para estes animais no Brasil (SOARES, 2002). Esta enfermidade é causada pelo protozoário *Cytauxzoon felis* (subfilo Apicomplexa, ordem Piroplasmida, família Theileriidae), que tem como transmissor, experimentalmente reconhecido, o carrapato *Dermacentor variabilis* (WAGNER, 1976; KIER, 1979; BLOUIN et al., 1984; 1987; MEHLHORN et al., 1994).

Os parasitos da família Theileriidae são caracterizadas biologicamente por realizarem no hospedeiro vertebrado um ciclo esquizogônico e um com divisão binária simples no eritrocítico (NEITZ, 1956; KOCAN et al., 1992; MEHLHORN et al., 1994; UILENBERG, 1995). As espécies pertencentes ao gênero *Cytauxzoon* realizam esquizogonia em histiócitos de vários órgãos como fígado, baço, pulmão, coração, rins, linfonodos e cérebro, onde determina oclusão parcial ou total de vasos sanguíneos (BROCKLESBY, 1962; KIER et al., 1987; KOCAN et al., 1992; GARNER et al., 1996); enquanto que espécies do gênero *Theileria* se multiplicam tipicamente em linfócitos circulantes (NEITZ, 1956; 1957; MEHLHORN et al., 1994).

As formas intraeritrocíticas de *C. felis* têm sido observadas em esfregaços sanguíneos de lince, pumas, guepardo, tigre de bengala, tigre branco, onça pintada, gato-do-mato pequeno, gato doméstico e ovinos (KIER et al., 1982a; 1987; GARNER et al., 1996; JAKOB & WESEMEIER, 1996; SOARES, 2002).

As descrições morfológicas de formas intraeritrocíticas deste agente têm sido realizadas baseando-se em aspectos observados por microscopia fotônica (FERRIS, 1979; ZINKL et al., 1981; MEIER & MOORE, 2000). Poucos são os conhecimentos de ultraestrutura de *Cytauxzoon* spp, os trabalhos relatam principalmente alguns detalhes das formas esquizogônicas teciduais (SIMPSON et al., 1985a; KOCAN et al., 1992) e muitas dúvidas persistem quando a essas formas e as intraeritrocíticas (SIMPSON et al., 1985b; KOCAN et al., 1992; UILENBERG, 1995; GARNER et al., 1996). Ademais, as informações existem para ambas as formas foram baseadas em dados obtidos por microscopia eletrônica de *Theileria* spp (MEHLHORN et al., 1994).

O presente estudo teve como objetivo descrever aspectos ultraestruturais, por

microscopia eletrônica de transmissão, de formas evolutivas eritrocíticas de *Cytauxzoon felis simile* em gatos domésticos no Brasil.

4.2. Material e Métodos

4.2.1. Origem e multiplicação de *Cytauxzoon felis simile*

Foi utilizado um isolado de *C. felis simile*, obtido a partir de uma onça pintada (*Panthera onca*), macho, com cinco anos de idade, naturalmente parasitada, cativa em um Zoológico no Município de Volta Redonda (altitude = 390m, latitude sul = 22° 31' 23" e longitude oeste = 44° 06' 15") (CIDE, 1997), Estado do Rio de Janeiro (SOARES, 2002).

Dois gatos doméstico (*Felis catus*), machos, com idade entre seis meses e um ano, foram inoculados (1,0 ml) por via sub-cutânea com sangue coletado do felino silvestre doador. Cada gato recebeu dois inóculos com intervalo de trinta dias entre eles. Esses animais foram doados pelo Centro de Controle de Zoonoses do Município do Rio de Janeiro, Estado do Rio de Janeiro.

4.2.2. Acompanhamento experimental

Os animais foram mantidos em ambiente isolado, segundo recomendações do Serviço de Sanidade Animal / Delegacia Federal de Agricultura/RJ – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, no biotério do Laboratório de Doenças Parasitárias – Projeto Sanidade Animal, Município de Seropédica (altitude = 26m, latitude sul = 22° 44' 38" e longitude oeste = 43° 42' 27") (CIDE, 1997), Estado do Rio de Janeiro. Esses foram alimentados com água e ração para gatos, *ad libitum* e foram acompanhados pelo período de um ano.

Após inoculação experimental, os gatos foram observados diariamente quanto aos parâmetros clínicos. Esfregaços foram confeccionados, a cada três dias, a partir de

sangue obtido por venopunção de vasos marginais da orelha, dos dois animais e durante todo o período experimental. Os esfregaços sangüíneos periféricos foram secos ao ar, fixados em álcool metílico absoluto e corados pelo Giemsa diluído em tampão sorensen pH 6,8 (LUBINSKY, 1960). Para processamento por microscopia eletrônica de transmissão (MET), coletou-se sangue dos animais quando esses apresentaram parasitemia de 0,29% e 0,98%, para o gato 1 e o gato 2, respectivamente.

4.2.3. Procedimento para microscopia eletrônica de transmissão

O sangue dos dois gatos domésticos foi coletado por venopunção radial em tubos de ensaio do tipo *vacutainer* contendo anticoagulante citrato-fosfato-dextrose. O sangue mantido sob refrigeração, foi levado ao Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biofísica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, *Campus* da UFRJ, onde foi processado para análise microscópica.

As amostras foram fixadas em solução tampão caccodilato 0,1M, pH 7,3, adicionado de glutaraldeído a 2,5%, paraformaldeído a 4% e sacarose a 5%, durante duas horas em temperatura ambiente, segundo protocolo de rotina do Laboratório. Em seguida, o sangue foi lavado por centrifugação, em solução tampão caccodilato 0,1M, pH 7,3, adicionado de sacarose a 5%; três vezes, a 10.000 rpm, por dois minutos.

A pós-fixação do material foi realizada com tetróxido de ósmio (OsT4) a 1% adicionado do ferricianeto de potássio a 0,8%, durante 30 minutos, a 4 °C. Após esta etapa as amostras foram lavadas por centrifugação como descrito anteriormente. Após a lavagem, o *pellet* obtido foi submetido a desidratação em série crescente de acetona (50, 70, 90 e 100%) permanecendo 15 minutos em cada diluição, em temperatura ambiente.

O material desidratado foi cortado em microfragmentos e incluído em acetona-epon em diluições decrescentes (2:1 acetona-epon, 1:1 acetona-epon e 1:2 acetona-epon), durante duas horas cada, até a utilização do epon puro por oito horas, em temperatura ambiente. Posteriormente, os microfragmentos foram colocados em moldes plásticos e emblocados em epon puro por 48 horas, em temperatura de 60 °C.

4.2.3.1. Ultracortes

Foram confeccionados ultracortes com espessura de 75 ηm , utilizando navalha de diamante, em ultramicrotomo automático (Ultracut, Reichert). Após microtomia, os cortes foram distendidos sobre água em temperatura ambiente e montados em microgrades para MET. Realizou-se a contrastação dos preparados com acetato de uracila, por 45 minutos e citrato de chumbo por mais cinco minutos. Posteriormente, as amostras foram lavadas e secas em estufa a 37 °C, durante cinco minutos e examinadas em microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss EM 900).

4.2.4. Fotomicrografias

As fotomicrografias de ultraestrutura de *C. felis simile* foram realizadas com o auxílio de uma câmara fotográfica acoplada ao microscópio eletrônico de transmissão, sob diferentes aumentos. Utilizou-se filme para fotos preto e branco em papel (asa 100, Kodak).

4.3. Resultados

Por meio da análise por MET de trofozoítos eritrocíticos de *C. felis simile* foi possível observar, predominantemente, formas parasitárias do tipo alongadas em diferentes fases de desenvolvimento (Fig.10 A, B e C). Outras formas, em desenvolvimento, também foram observadas como formas esféricas e em tétrede com trofozoítas interligados por pregas citoplasmáticas (forma de cruz-de-Malta) (Fig. 11 A e C). Verificou-se, ainda, um agrupamento de 12 trofozoítas em processo de separação e individualização (Fig. 11 B).

Os trofozoítos de *C. felis simile* foram caracterizados por apresentarem limitados por dupla membrana citoplasmática delgadas (Fig. 10 e 11). Possuem um único núcleo excêntrico circundado por uma membrana dupla delgada, e ocupa completamente um dos pólos do parasito (Fig. 10 e 11).

Apresenta mitocôndrias atípicas, sem cristas, com dupla membrana bem delimitadas e localiza-se, em geral, no pólo oposto ao do núcleo (Fig. 10 A). Os vacúolos digestivos são limitados por dupla membrana, alguns contêm em seu interior estroma de eritrócitos, e uns apresentam-se mais eletrodensos que outros (Fig. 10 A, B e C).

Microtúbulos extranucleares, ribossomos, retículo endoplasmático e lisossomos encontram-se dispersos por todo o citoplasma do trofozoíto (Fig.10). Citóstoma com dupla membrana também pôde ser observado (Fig.10 A). Pregas citoplasmáticas podem ser visualizadas interligando três formas durante o processo de divisão binária (Fig. 112 A). Não foi observado vacúolo parasitóforo em nenhum eritrócito parasitado por *C. felis simile*.

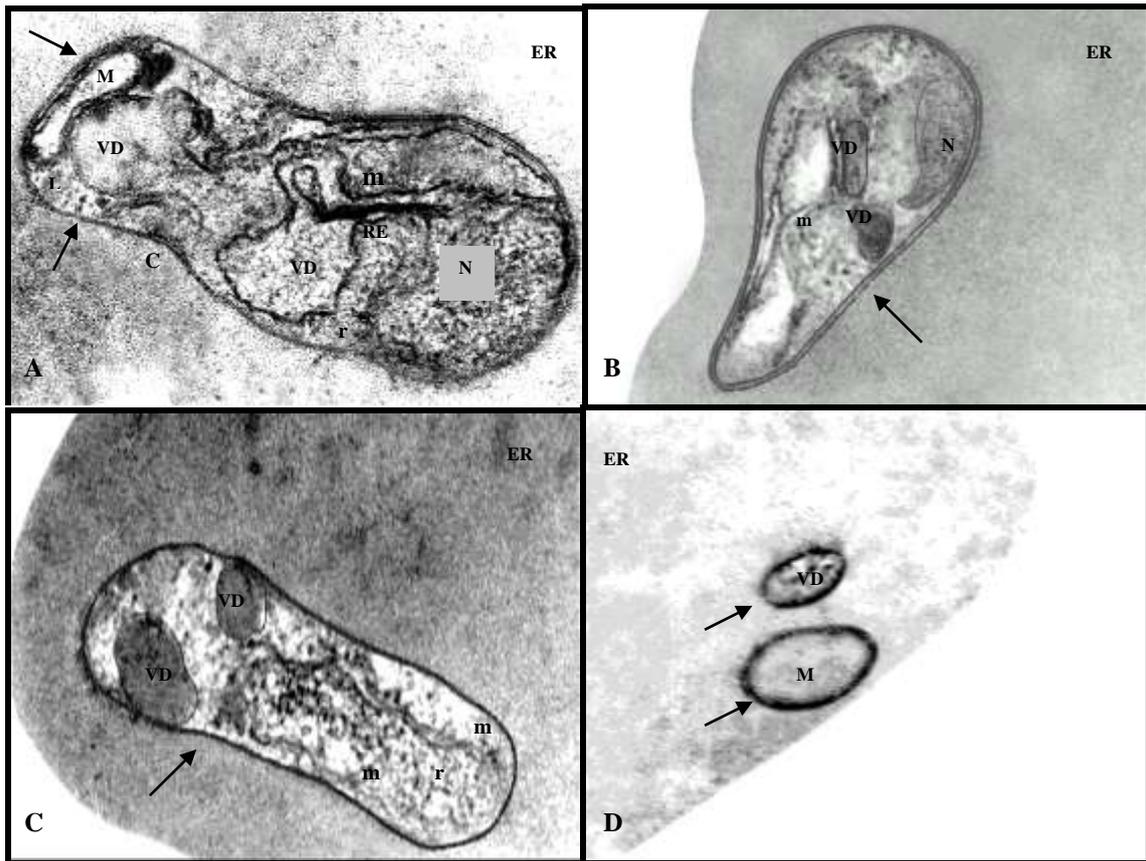


Fig. 11- Ultraestrutura de trofozoítos eritrocíticos de *C. felis simile*. **A**, Trofozoíto no interior de eritrócito (**ER**) com dupla membrana delgada (\rightarrow); núcleo único excêntrico (**N**), ocupando completamente um dos pólos do parasito; mitocôndria atípica, sem cristas, com dupla membrana (**M**); vacúolos digestivos limitados por dupla membrana, contendo em seu interior restos eritrocíticos; presença de citóstoma com dupla membrana; microtúbulos extranucleares (**m**), ribossomos (**r**), retículo endoplasmático (**RE**) e lisossomos (**L**) dispersos por todo o citoplasma (MET, 85.000x). **B**, **C**, Trofozoíto com membrana citoplasmática dupla, vacúolos digestivos eletrodensos contendo restos eritrocíticos; microtúbulos extranucleares e ribossomos dispersos pelo citoplasma (MET, 50.000x). **D**, Trofozoíto em corte transversal apresentando mitocôndria atípica (**M**) e vacúolos digestivos contendo restos eritrocíticos, ambos limitados por dupla membrana (MET, 85.000x). Não foi observado vacúolo parasitóforo em nenhuma forma parasitária examinada.

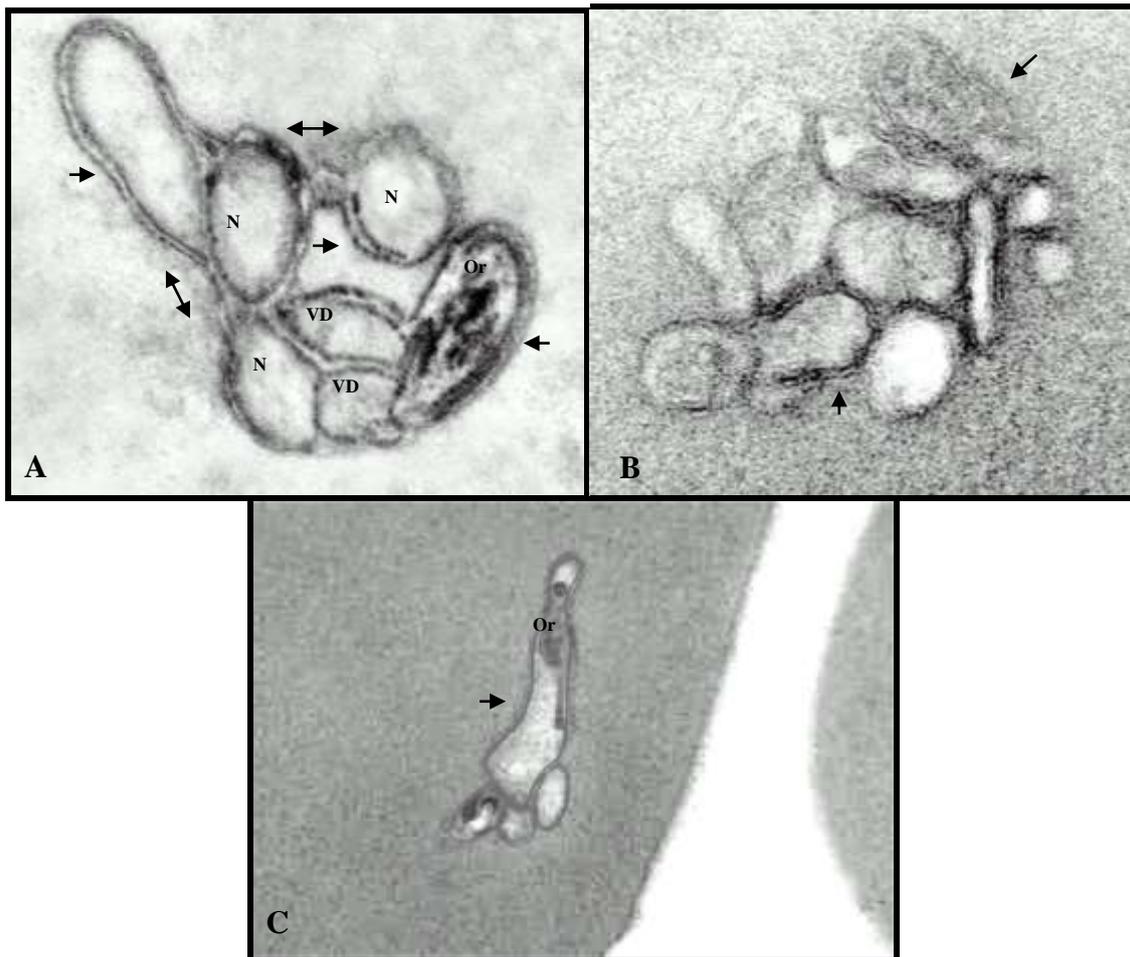


Fig. 12 – Ultraestrutura de trofozoítos intraeritrocíticos de *C. felis simile* em divisão. **A**, Três trofozoítos com dupla membrana delgada limitante (\rightarrow), único núcleo excêntrico (N), ocupando completamente um dos pólos de cada forma parasitária; organelas eletrodensas presentes em uma das formas em divisão (Or), e presença de pregas citoplasmáticas (\leftrightarrow) interligando as três formas durante o processo de divisão binária (MET 85.000x). **B**, Doze trofozoítos individualizados com dupla membrana delgada limitante (MET 85.000x). **C**, Trofozoíto em forma de tétrade apresentando dupla membrana limitante (\rightarrow) e organelas eletrodensas em um pólo de uma das formas (Or) (MET 20.000x). Não foi observado vacúolo parasitóforo em nenhuma forma parasitária examinada.

4.4. Discussão

Os aspectos ultraestruturais de trofozoítos eritrocíticos de *C. felis simile* observados no presente trabalho são comparados com as descrições conhecidas para as formas intrahistiocíticas de *C. felis*, intralinfocíticas de *Theileria* spp ou eritrocíticas de ambos os gêneros. Contudo, pelo fato do pouco conhecimento sobre trofozoítos de *Cytauxzoon* spp, o gênero *Theileria* será mais explorado.

Espécies do gênero *Theileria* e *Cytauxzoon* são morfologicamente parecidas quanto às suas formas intraeritrocíticas e diferem, entretanto, nas formas esquizogônicas (MEHLHORN & SCHEIN, 1984; SIMPSON *et al.*, 1985a; 1985b; UILENBERG *et al.*, 1987; MEHLHORN *et al.*, 1994). Estudos desenvolvidos por KOCAN *et al.* (1992) revelaram por meio de análises ultraestruturais que no gênero *Cytauxzoon* somente um merozoíta penetra no histiócito, enquanto que para *Theileria* spp ocorrem múltiplas invasões em linfócitos (NEITZ, 1956; 1957; MEHLHORN & SCHEIN, 1984; MEHLHORN *et al.*, 1994).

Esquizonte de *C. felis* encontra-se no citoplasma de macrófagos aderidos ao endotélio de vasos sangüíneos de vários órgãos (FERRIS, 1979; KIER *et al.*, 1987). Por MET foi verificado que o desenvolvimento inicial de esquizontes de *C. felis* assemelha-se a uma massa sincicial que progressivamente realiza divisão citoplasmática. Membrana limitante simples, mitocôndria, retículo endoplasmático, anel polar, citóstoma, núcleo, roptrias e micronemas foram identificados (SIMPSON *et al.*, 1985a; KOCAN *et al.*, 1992). Os merozoítos são formados a partir dessa massa sincicial e estruturas como núcleo individualizado, roptrias e micronemas, opostos ao núcleo, são visualizados. Na esquizogonia de *C. felis*, a ruptura da célula hospedeira só ocorre após a completa maturação dos merozoítas (SIMPSON *et al.*, 1985a).

As análises ultraestruturais de espécies do gênero *Theileria* revelaram que os trofozoítos apresentam-se basicamente em formas de vírgula e esférico (MEHLHORN *et al.*, 1994). No entanto, no presente trabalho houve o predomínio de formas do tipo alongadas, embora fossem observadas, também, formas esféricas e em tétrede. Em *Theileria*, as formas em vírgula possuem uma membrana citoplasmática simples remanescente do complexo pelicular interno que muitas vezes é conservado. Vacúolo parasitóforo está ausente, embora algumas vezes, uma membrana inclusa, possa ser visível. Esta membrana, quando presente, é a membrana do eritrócito que invagina

durante a penetração e desintegra-se durante o desenvolvimento do parasito (MEHLHORN & SCHEIN, 1984; MEHLHORN *et al.*, 1994). Diferente do reportado por esses autores, em *C. felis simile* os trofozoítos possuem membrana citoplasmática dupla e bem delimitada, mesmo quando do parasito maduro, o que indica que esta dupla membrana não deve ser remanescente do eritrócito. Entretanto, também não foi observado vacúolo parasitóforo. Curiosamente, para o gênero *Babesia*, no interior do eritrócito pode apresentar vacúolo parasitóforo, e a membrana citoplasmática é simples (KAKOMA & MEHLHORN, 1994).

Para teileria, o núcleo, em geral possui a forma de gota e ocupa um dos pólos desta forma parasitária. A membrana nuclear persiste durante a divisão e microtúbulos extranucleares estão presentes (MEHLHORN & SCHEIN, 1984; MEHLHORN *et al.*, 1994). No outro pólo, o parasito está provido de um microporo (citóstoma) que forma uma invaginação e nesta região o complexo pelicular interno forma uma estrutura cilíndrica ao redor do prolongamento do microporo invaginando-se. Nenhum sistema de anel polar é visto, nem estão presentes microtúbulos subpeliculares (MEHLHORN & SCHEIN, 1984; MEHLHORN *et al.*, 1994). Os trofozoítos de babésia possuem núcleo disperso no citoplasma, anéis polares apical e posterior, roptrias bem definidas e microtúbulos subpeliculares (MEHLHORN & SCHEIN, 1984; KAKOMA & MEHLHORN, 1994). *C. felis simile*, apresentou as características semelhantes as de *Theileria*; no entanto, o núcleo, em geral, possui o formato arredondado.

As formas em vírgulas de *Theileria* spp são caracterizadas por apresentarem vacúolos digestivos com parede dupla, opostos ao núcleo, que geralmente acumulam estroma de eritrócito. Pequenos grânulos eletrodensos (0,1µm de diâmetro) estão próximos a estes vacúolos. O retículo endoplasmático está presente, mas grânulos de polissacarídeos ou Golgi estão ausentes (MEHLHORN & SCHEIN, 1984; MEHLHORN *et al.*, 1994). Estas estruturas foram verificadas para *C. felis simile*, no presente trabalho. Diferentes destes parasitos; *Babesia* spp possuem grandes vacúolos digestivos dispersos no citoplasma e, aparentemente, circundado por um membrana simples (MEHLHORN & SCHEIN, 1984; KAKOMA & MEHLHORN, 1994).

Curiosamente, *T. velifera* e *Theileria gorgonis* possuem núcleo indistinto e vacúolo digestivo com membrana limitante simples. Para *T. annulata*, foram descritos trofozoítos com formas em vírgula e esférico, ambos circundados por membrana citoplasmática simples; no entanto, a fissão binária ocorre somente nas formas em

vírgulas (MEHLHORN & SCHEIN, 1984; SIMPSON *et al.*, 1985b).

Os trofozoítos de *Theileria* spp dividem-se por fissão binária, originando inicialmente um estágio semelhante à forma de “Y” e posteriormente duas formas filhas. As formas em vírgula não são oriundas de merogonia, visto que merontes verdadeiros não ocorrem em eritrócitos; entretanto, em algumas espécies de *Theileria* como *T. parva*, *T. mutans*, *T. orientalis* e *T. sergenti*, quatro merozoítas ocasionalmente estão dispostos em tétrede ou cruz-de-Malta (MEHLHORN *et al.*, 1994). Curiosamente, algumas espécies de *Babesia* como *B. equi*, *B. microti* e *B. brasiliensis*, também podem apresentar-se sob a forma de tétrede (KAKOMA & MEHLHORN, 1994; UILENBERG, 1995). O fato é que neste tipo de multiplicação, o núcleo e o citoplasma dividem-se simultaneamente, não ocorrendo formação de massa sincicial presente na merogonia verdadeira (MEHLHORN & SCHEIN, 1984; MEHLHORN *et al.*, 1994). Em *C. felis simile* se observou esse tipo de arranjo de trofozoítos, como também foi possível verificar doze trofozoítos agrupados; no entanto, estas formas estão interligadas por filamentos citoplasmáticos, possuem membranas citoplasmáticas independentes bem como organelas internas independentes para cada trofozoíto. Estes detalhes ultraestruturais, em *C. felis simile*, contribuem para com a hipótese de que os Piroplasmida não realizam esquizogonia eritrocítica; fenômeno tipicamente observado em Haemosporina.

As formas esféricas em *Theileria* são gamontes que originam estágios semelhantes aos gametas no intestino de carrapatos. Diferente das formas em vírgula, não reproduzem no hospedeiro vertebrado. São limitadas por uma membrana celular única que não são remanescentes da película interna. A dupla parede das estruturas polares presentes nas formas em vírgula estão ausentes nas formas esféricas, mas organelas como mitocôndria são visualizadas. Vacúolos estão presentes contendo material eritrocítico e grânulos esféricos pequenos, eletrodensos são visualizados. Estes possuem um diâmetro de 0,5-0,6 μm , são osmiofílicos e estão limitados por uma membrana. Em geral as formas esféricas são mais eletroluscentes que as em formato de vírgula (MEHLHORN & SCHEIN, 1984; MEHLHORN *et al.*, 1994). Os trofozoítas de *C. felis simile* estudados apresentaram muitas estruturas semelhantes às formas em vírgula descritas para espécies de *Theileria*, diferindo quanto a membrana citoplasmática que apresenta dupla camada. Formas esféricas, alongadas semelhantes à vírgula e em tétrede também foram visualizadas no presente estudo.

Aparentemente até 1985 a ultraestrutura de formas intraeritrocíticas de *C. felis* não havia sido descrita; realizando-se estudos comparativos com várias espécies de *Theileria* que afetam ruminantes. Os resultados encontrados por SIMPSON *et al.* (1985b) ao analisarem formas eritrocíticas de *C. felis* em gatos domésticos inoculados experimentalmente, revelaram a presença de dupla membrana citoplasmática, núcleos fracamente definidos contendo delicada cromatina, um ou dois retículo endoplasmático rugoso, ribossomos livres, mitocôndria não pregueada, vacúolo alimentar com hemoglobina aparente e um citóstoma com membrana plasmática simples circundando o parasito. Resultados semelhantes foram relatados para *Cytauxzoon* sp por KIER *et al.* (1987) em gatos infectados experimentalmente; por BUTT *et al.* (1991) em uma pantera da Flórida (*Felis concolor coryi*); por JARDINE (1992) em tsessebe (*Damaliscus lunatus*), ruminante silvestre africano; e por JAKOB & WESEMEIER (1996) em um tigre de Bengala, na Alemanha. No presente estudo os trofozoítos de *C. felis simile* apresentaram aspecto ultraestrutural muito similar ao descrito para *C. felis*, diferindo na membrana limitante do citóstoma que, como a membrana citoplasmática, também é dupla.

5. CONCLUSÕES

Diante dos resultados do presente estudo, pode-se concluir:

- i) O agente estudado trata-se de um Theileriidae;
- ii) *Cytauxzoon felis simile* é um theilerídeo altamente pleomórfico;
- iii) os tipos morfológicos ovóide e anel-de-rubi são importantes para o diagnóstico hemoscópico da citauxzoonose felina no Brasil, por predominarem em todas as fases de ambos isolados;
- iv) a morfologia, a morfometria e os aspectos ultraestruturais dos trofozoítos eritrocíticos de *C. felis simile* são similares aos observados em *C. felis*, nos EUA;
- v) *C. felis simile*, sob os aspectos ultraestruturais, apresenta características peculiares, que o difere de *Theileria* sp. e de *Babesia* sp.; e
- vi) o agente estudado é uma espécie próxima de *C. felis*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLSOPP, M. T. E. P.; CAVALIER-SMITH, T.; DE WAAL, D. T. & ALLSOPP, B. A. 1994. Phylogeny and evolution of the piroplasms. *Parasitology*, 108: 147-152.
- ARAGÃO, H. & FONSECA, F. 1961. Notas de ixodologia. VIII. Lista e chave para os representantes da fauna ixodológica brasileira. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 59: 115-130.
- BALASHOV, Y. S. 1972. A translation of bloodsucking ticks (ixodoidea) – vectors of diseases of man and animals. *Misc. Publ. Entomol. Soc. Am.*, 8(5): 159-376.
- BARR, S. C.; BOWMAN, D. D.; PHILLIPS, L. G. & BARR, M. C. 1993. *Trypanosoma manulis* N. Sp. from the Russian pallas cat *Felis manul*. *J. Euk. Microbiol.*, 40(3): 233-237.
- BANETH, G.; AROCH, I.; TAL, N. & HARRUS, S. 1998. *Hepatozoon* species infection in domestic cats: a retrospective study. *Vet. Parasitol.*, 79: 123-133.
- BARNETT, S. F. 1977. *Theileria*. In: KREIER, J. P. *Parasitic Protozoa*. Vol. 4. Academic Press, New York. p. 77-114.
- BEAUFLLS, J-P.; MARTIN-GRANEL, J. & JUMELLE, P. 1998. *Hepatozoon* spp parasitaemia and feline leukemia virus infection in two cats. *Feline Pract.*, 26(3): 10-13.
- BERENDT, A. R.; FERGUNSON, D. J. P.; GARDINER, J.; TURNER, G.; ROWE, A.; McCORMICK, C.; ROBERTS, D.; CRAIG, A.; PINCHES, R.; ELFORD, B. C. & NEWBOLD, C. I. 1994. Molecular mechanisms of sequestration in malaria. *Parasitol.*, 108: S19-S28.
- BLOUIN, E. F.; KOCAN, A. A.; GLENN, B. L. & KOCAN, K. M. 1984. Transmission of *Cytauxzoon felis* Kier, 1979 from bobcats, *Felis rufus* (Schreber), to domestic cats by *Dermacentor variabilis* (Say). *J. Wildlife Dis.*, 20(3): 241-242.
- BLOUIN, E. F.; KOCAN, A. A. & KOCAN, K. M. 1987. Evidence of a limited schizogonous cycle for *Cytauxzoon felis* in bobcats following exposure to infected ticks. *J. Wildlife Dis.*, 23(3): 499-501.

- BOBADE, P. A. & NASH, A. S. 1987. A comparative study of the efficiency of acridine orange and some Romanowsky staining procedures in the demonstration of *Haemobartonella felis* in feline blood. *Vet. Parasitol.*, 26: 169-172.
- BÖCK, P. 1989. *Romeis Mikroskopische Technik*. Ufban und Schwazenberg, München. 697p.
- BOURDEAU, P. 1996. Les babesioses félines. *Le Point Vet.*, 27(173): 947-953.
- BROCKLESBY, D. W. 1962. *Cytauxzoon taurotragi* Martin & Brocklesby, 1960 a piroplasm of the eland (*Taotragus oryx pattersonianus* Lydekker, 1906). *Res. Vet. Sci.*, 3: 334-348.
- BRONSDON, M. A.; HOMER, M. J.; MAGERA, J. M. H.; HARRISON, C.; ANDREWS, R. G.; BIELITZKI, J. T.; EMERSON, C. L.; PERSING, D. H. & FRITSCH, T. R. 1999. Detection of enzootic babesiosis in baboons (*Papio cynocephalus*) and phylogenetic evidence supporting synonymy of the genera *Entopolypoides* and *Babesia*. *J. Clin. Microbiol.*, 37(5): 1548-1553.
- BUTT, M. T.; BOWMAN, D.; BARR, M. C. & ROELKE, M. E. 1991. Iatrogenic transmission of *Cytauxzoon felis* from a Florida panther (*Felis concolor coryi*) to a domestic cat. *J. Wildlife Dis.*, 27(2): 342-347.
- CARMICHAEL, I. H. & HOBDAV, E. 1975. Blood parasites of some wild bovidae in Botswana. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 42: 55-62.
- CAVALIER, E. P. & SMITH, W. A. 1993. Kingdom Protozoa and its 18 Phyla. *Microbiol. Rev.*, 54: 953-993.
- CIDE. 1997. *Território, Rio de Janeiro*. Fundação de Informação e Dados do Rio de Janeiro. 80p.
- CLARK, R. 1942. *Eperythrozoon felis* (Sp. Nov.) in a cat. *J. South Afr. Vet. Med. Assoc.*, XIII: 15-16.
- COLES, E. H. 1984. *Patologia Clínica Veterinária*. 3ª edição. Editora Manole, São Paulo. 566p.

- COX, F. E. G. 1994. The evolutionary expansion of the sporozoa. *Inter. J. Parasitol.*, 24: 1301-1316.
- COWELL, R. L.; FOX, J. C.; PANCIERA, R. J. & TYLER, R. D. 1988. Detection of anticytauxzoon antibodies in cats infected with a *Cytauxzoon* organism from bobcats. *Vet. Parasitol.*, 28: 43-52.
- DAVIES, L. J. 1929. On a piroplasm of the Sudanese wild cat (*Felis ocreata*). *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.*, XXII(6): 523-534.
- DENNIG, H. K. 1967. Eine unbekannte babesienart beim jaguarundi (*Herpailurus yaguarondi*). *Die Kleintierpraxis*, 12: 146-152.
- DENNIG, H. K. & BROCKLESBY, D. W. 1972. *Babesia pantherae* sp. nov., a piroplasm of the leopard (*Panthera pardus*). *Parasitol.*, 64: 525-532.
- ESKOW, E.; KRAUSE, P. J.; SPIELMAN, A.; FREEMAN, K. & ASLANZADEH, J. 1999. Southern extension of the range of human babesiosis in the Eastern United States. *J. Clin. Microbiol.*, 37(6): 2051-2052.
- FERRIS, D. H. 1979. A progress report on the status of a new disease of American cats: Cytauxzoonosis. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.*, 1: 269-276.
- FOREYT, W. J. 1989. Diagnostic parasitology. *Vet. Clin. North Am. Small Ani. Pract.*, 19(5): 979-1001.
- GARDINER, C. H. 1998. Comunicação pessoal. (Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC, USA). Seminário apresentado no Departamento de Parasitologia Animal da UFRRJ, Brasil, em 19 de dezembro de 1998.
- GARNER, M. M.; LUNG, N. P.; CITINO, S.; GREINER, E. C.; HARVEY, J. W. & HOMER, B. L. 1996. Fatal cytauxzoonosis in a captive-reared white tiger (*Panthera tigris*). *Vet. Pathol.*, 33: 82-86.
- GLENN, B. L.; ROLLEY, R. E. & KOCAN, A. A. 1982. *Cytauxzoon*-like piroplasms in erythrocytes of wild-trapped bobcats in Oklahoma. *JAVMA.*, 181(11): 1251-1253.
- GLENN, B. L.; KOCAN, A. A. & BLOUIN, E. F. 1983. Cytauxzoonosis in bobcats. *JAVMA.*, 183(11): 1155-1158.

- GLENN, B. L. & STAIR, E. L. 1984. Cytauxzoonosis in domestic cats: report of two cases in Oklahoma, with a review and discussion of the disease. *JAVMA.*, 184(7): 822-825.
- GREENE, C. E.; LATIMEER, K.; HOPPER, E.; SHOEFFLER, G.; LOWER, K. & CULLENS, F. 1999. Administration of diminazene aceturate or imidocarb dipropionate for treatment of cytauxzoonosis in cats. *JAVMA.*, 215(4): 497-500.
- GROOTENHUIS, J. G.; YOUNG, A. S.; DOLAN, T. T. & STAGG, D. A. 1979. The characteristics of *Theileria* species (eland) infections in eland and cattle. *Res. Vet. Sci.*, 27: 59-68.
- HARMELIN, A.; DUBEY, J. P.; YOKOBSON, B.; NYSKA, A. & ORGAD, U. 1992. Concurrent *Hepatozoon canis* and *Toxoplasma gondii* infections in a dog. *Vet. Parasitol.*, 43: 131-136.
- HAUCK, W. N.; SNIDER, T. G. & LAWRENCE, J. E. 1982. Cytauxzoonose in a native Louisiana cat. *JAVMA.*, 180(12): 1472-1474.
- HAZEN-KARR, C. G.; KOCAN, A. A.; KOCAN, K. M. & HAIR, A. 1987. The ultrastructure of sporogony in *Theileria cervi* (Bettencourt *et al.*, 1907) in salivary glands of female *Amblyomma americanum* (L.) ticks. *J. Parasitol.*, 73(6): 1182-1188.
- HERNÁNDEZ, C. A. M.; SOARES, C. O.; MASSARD, C. L. & FONSECA, A. H. 1998. Histologia do intestino de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). *Rev. Bras. Ciênc. Vet.*, 5 (2): 79-81.
- HOARE, C. A. 1972. *The Trypanosomes of Mammals*. Blackwell Scientific Publications, Oxford. 749p.
- HOLDER, A. A. 1994. Proteins on the surface of the malaria parasite and cell invasion. *Parasitol.*, 108: S5-S18.
- HONER, M. R. 1990. *Amblyomma variegatum* – um novo carrapato para a América do Sul ? *Comunicado Técnico, CNPGC.*, 36: 1-4.
- HOOGSTRAAL, H. 1985. Argasid and Nuttalliellid ticks as parasites and vectors. *Adv. Parasitol.*, 24: 135-238.

- HOOVER, J. P.; WALKER, D. B. & HEDGES, J. D. 1994. Cytauxzoonosis in cats: Eight cases (1985-1992). *JAVMA.*, 205(3): 455-460.
- JAKOB, W. & WESEMEIER, H. H. 1996. A fatal infection in a bengal tiger resembling cytauxzoonosis in domestic cats. *J. Comp. Pathol.*, 114: 439-444.
- JARDINE, J. E. 1992. The pathology of cytauxzoonosis in a tsessebe (*Damaliscus lunatus*). *J. South Afr. Vet. Assoc.*, 63(1): 49-51.
- KAKOMA, I. & MEHLHORN, H. 1994. *Babesia* of domestic animals. In: KREIER, J. P. *Parasitic Protozoa*. 2nd edition, Vol. 7. Academic Press, New York. p. 141-216.
- KIER, A. B.; WIGHTMAN, S. R. & WAGNER, J. E. 1982a. Interspecies transmission of *Cytauxzoon felis*. *Am. J. Vet. Res.*, 43(1): 102-105.
- KIER, A. B.; WAGNER, J. E. & MOREHOUSE, L. G. 1982b. Experimental transmission of *Cytauxzoon felis* from bobcats (*Lynx rufus*) to domestic cats (*Felis domesticus*). *Am. J. Vet Res.*, 43(1): 97-101.
- KIER, A. B.; WAGNER, J. E. & KINDEN, D. A. 1987. The pathology of experimental cytauxzoonosis. *J. Comp. Pathol.*, 97: 415-432.
- KJEMTRUP, A. M.; THOMFORD, J.; ROBINSON, T. & CONRAD, P. A. 2000a. Phylogenetic relationships of human and wildlife piroplasm isolates in the Western United States inferred from the 18S nuclear small subunit RNA gene. *Parasitol.*, 120: 487-493.
- KJEMTRUP, A. M.; KOCAN, A. A.; WHITWORTH, L.; MEINKOTH, J.; BIRKENHEUER, A. J.; CUMMINGS, J.; BOUDREAUX, M. K.; STOCKHAM, S. L.; IRIZARRY-ROVIRA, A. & CONRAD, P. A. 2000b. There are at least three genetically distinct small piroplasms from dogs. *Inter. J. Parasitol.*, 30: 1501-1505.
- KOKAN, A. A. & BLOUIN, E. F. 1985. Hematologic and serum chemical values for free-ranging bobcats, *Felis rufus* (Schreber), with reference to animals with natural infections of *Cytauxzoon felis* Kier, 1979. *J. Wildlife Dis.*, 21(2): 190-192.
- KOCAN, A. A.; KOCAN, K. M.; BLOUIN, E. F. & MUKOLWE, S. W. 1992. A redescription of schizogony of *Cytauxzoon felis* in the domestic cat. *Ann. New York Acad. Sci.*, 653: 161-167.

- KRECEK, R. C.; BOOMKER, J.; PENZHORN, B. L. & SCHEEPERS, L. 1990. Internal parasites of giraffes (*Giraffa camelopardalis angolensis*) from Etosha National Park, Namibia. *J. Wildlife. Dis.*, 26(3): 395-397.
- KUTTLER, K. L. 1988. World-wide impact of babesiosis. In: RISTIC, M. *Babesiosis of Domestic Animals and Man*. CRC Press, Boca Raton. p. 1-22.
- LEVINE, N. D. 1971. Taxonomy of the piroplasms. *Trans. Am. Micros. Soc.*, 90: 2-33.
- LEVINE, N. D. 1985. *Veterinary Protozoology*. Iowa State University Press, Ames.
- LEVINE, N. D. 1988. *The Protozoan Phylum Apicomplexa*. Vols. 1 and 2. CRC Press, Boca Raton.
- LOPEZ-REBOLLAR, L. M.; PENZHORN, B. L.; DE WAAL, D. T. & LEWIS, B. D. 1999. A possible new piroplasm in lions from the Republic of South Africa. *J. Wildlife. Dis.*, 35(1): 82-85.
- LUBINSKY, G. 1960. Note of the use of McLrvaine`s buffer solutions in staining blood Protozoa. *Can. J. Zool.*, 38: 437-438.
- MacWILLIAMS, P. S. 1987. Erythrocytic rickettsia and protozoa of the dog and cat. *Vet. Clin. North Am. Small An. Pract.*, 17(6): 1443-1461.
- MARTIN, H. & BROCKLESBY, D. W. 1960. A new parasite of eland. *Vet. Rec.*, 72: 331-332.
- McCULLY, R. M.; KEEP, M. E.; BASSON, P. A. 1970. Cytauxzoonosis in a giraffe (*Giraffa camelopardalis* (Linneaus, 1758)) in Zululand. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 37: 7-10.
- MEHLHORN, H. & SCHEIN, E. 1984. The piroplasms: life cycle and sexual stages. *Adv. Parasitol.*, 23: 37-103.
- MEHLHORN, H. 1988. *Parasitology in Focus*. (editor). Springer-Verlag, Berlin.
- MEHLHORN, H.; SCHEIN, E. & AHMED, J. S. 1994. *Theileria*. In: KREIER, J. P. *Parasitic Protozoa*. 2nd edition, Vol. 7. Academic Press, New York. p. 217-304.

- MEIER, H. T. & MOORE, L. E. 2000. Feline cytauxzoonosis: a case report and literature review. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, 36: 493-496.
- MEINKOTH, J.; KOCAN, A. A.; WHITWORTH, L.; MURPHY, G.; FOX, J.C. & WOODS, J. P. 2000. Cats surviving natural infection with *Cytauxzoon felis*: 18 cases (1997 – 1998). *J. Vet. Intern. Med.*, 14: 521-525.
- MOTZEL, S. L. & WAGNER, J. E. 1990. Treatment of experimentally induced cytauxzoonosis in cats with parvaquone and buparvaquone. *Vet. Parasitol.*, 35: 131-138.
- MUDALIAR, S. V.; ACHARY, G. R. & ALWAR, V. S. 1950. On a species of *Babesia* in a Indian wild cat (*Felis catus*). *Ind. Vet. J.*, 26: 391-395.
- NEIMARK, H.; JOHANSSON, K. E.; RIKIHISA, Y. & TULLY, J. G. 2001. Proposal to transfer some members of the genera *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* to genus *Mycoplasma* with descriptions of *Candidatus Mycoplasma haemofelis*, *Candidatus Mycoplasma haemomuris*, *Candidatus Mycoplasma haemosuis* and *Candidatus Mycoplasma wenyonii*. *Intern. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 51: 891-899.
- NEITZ, W. O. & THOMAS, A. D. 1948. *Cytauxzoon sylvicaprae* gen. nov., spec. nov., a protozoan responsible for a hitherto undescribed disease in the duiker *Sylvicapra grimmia* (Linné). *Onderstepoort J. Vet. Sci. An. Indust.*, 23: 63-76.
- NEITZ, W. O. 1956. Classification, transmission and biology of piroplasms of domestic animals. *Ann. New York Acad. Sci.*, 64: 56-111.
- NEITZ, W. O. & de LANGE, M. 1956. Onderstepoort, Experimental observations. (citado em NEITZ, 1957).
- NEITZ, W. O. 1957. Theileriosis, gonderiosis and cytauxzoonosis: a review. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 27: 275-430.
- O'CONNOR, R. M.; LONG, J. A. & ALLRED, D. R. 1999. Cytoadherence of *Babesia bovis*-infected erythrocytes to bovine brain capillary endothelial cells provides an in vitro model for sequestration. *Infect. Immun.*, 67(8): 3921-3928.
- PARRODI, F. & WALTISBUHL, D. J. 1991. Immunopathophysiology of acute babesiosis. *VII Sem. Bras. Parasitol. Vet.*, São Paulo, p. 8-13.

- PAVLOVSKY, E. N. 1965. *Natural Nidality of Transmissible Diseases*. Peace Publishers, Moscow. 250p.
- PEIXOTO, P. V.; SOARES, C. O.; SANTIAGO, C. D.; BARROS, S. S.; BARROS, C. L. S. & CUNHA, B. M. 1999. Citauxzoonose fatal em leões (*Panthera leo*) no Brasil. In: *XXVI CONG. BRAS. MED. VET.*, Campo Grande. Anais... 1999. p. s/n.
- PEREGRINE, A. S. 1994. Chemotherapy and delivery systems: haemoparasites. *Vet. Parasitol.*, 54: 223-248.
- ROTSTEIN, D. S.; TAYLOR, S. K.; HARVEY, J. W. & BEAN, J. 1999. Hematologic effects of cytauxzoonosis in Florida panthers and Texas cougars in Florida. *J. Wildlife Dis.*, 35(3): 613-617.
- SCHEIN, E. 1975. On the life cycle of *Theileria annulata* (Dschunkowsky and Lunhs, 1904) in the midgut and hemolymph of *Hyalomma anatolicum excavatum* (Kock, 1844). *Z. Parazitenk.*, 47: 165-167.
- SCHROEDER, W. F.; COX, H. W. & RISTIC, M. 1966. Anemia, parasitaemia, erythrophagocytosis, and haemagglutinins in *Babesia rodhaini* infection. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 66 (1): 31-38.
- SCOFIELD, A.; SOARES, C. O.; MANERA, G. B.; FONSECA, A.H.; PEIXOTO, P. V.; & GONZALEZ, A. A. P. 1999. Citauxzoonose felina experimental em gato doméstico (*Felis catus*). In: *XI SEM. BRAS. PARASITOL., II SEM. PARASIT. VET. DOS PAÍSES DO MERCOSUL.*, Salvador. Anais... 1999. p. 236.
- SELL, S.; BERKOWER, I. & MAX, E. E. 1996. *Immunology, Immunopathology & Immunity*. 5th edition. Appleton & Lange, Stamford. 1014p.
- SHINDEL, N.; DARDIRI, A. H. & FERRIS, D. H. 1978. An indirect fluorescent antibody test for the detection of *Cytauxzoon*-like organisms in experimentally infected cats. *Can. J. Comp. Med.*, 42: 460-465.
- SIMPSON, C. F.; HARVEY, J. W.; LAWMAN, M. J. P.; MURRAY, J.; KOCAN, A. A. & CARLISLE, J. W. 1985a. Ultrastructure of schizonts in the liver of cats with experimentally induced cytauxzoonosis. *Am. J. Vet. Res.*, 46(2): 384-390.

- SIMPSON, C. F.; HARVEY, J. W. & CARLISLE, J. W. 1985b. Ultrastructure of the intraerythrocytic stage of *Cytauxzoon felis*. *Am. J. Vet. Res.*, 46(5): 1178-1180.
- SOARES, C. O.; PEIXOTO, P. V.; SCOFIELD, A.; FONSECA, A.H.; MASSARD, C. L. & SANTIAGO, C. D. 1999a. *Cytauxzoon* sp. Neitz & Thomas, 1948 (Apicomplexa: Theileriidae) em *Panthera onca*. In: XI SEM. BRAS. PARASITOL., II SEM. PARASITOL. VET. DOS PAÍSES DO MERCOSUL., Salvador. Anais... 1999. p. 235.
- SOARES, C. O.; PEIXOTO, P. V.; SCOFIELD, A.; FONSECA, A.H. & SANTIAGO, C. D. 1999b. *Cytauxzoon* sp. Neitz & Thomas, 1948 (Apicomplexa: Theileriidae) em *Felis tigrina* (*Leopardus tigrinus*) no Brasil. In: XXVI CONG. BRAS. MED. VET., Campo Grande. Anais... 1999. p. s/n.
- SOARES, C. O. 2002. *Estudos Biológicos e Clínico-patológico da Citauzoonose Causada por Cytauxzoon felis simile (Apicomplexa: Theileriidae), no Brasil*. Tese de Doutorado, Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias – Parasitologia Veterinária: UFRRJ. 150p.
- SONENSHINE, D. E. 1991. *Biology of Ticks*. Vol. 2. Oxford University Press, New York. 464p.
- SPRENT, E. 1992. Parasites lost. *Intern. J. Parasitol.*, 22: 139-151.
- STAGG, D. A.; KANHARI, G. K.; YOUNG, A. S. & BROWN, C. G. D. 1976. The establishment of *Theileria*-infected cell lines from an eland (*Taurotragus oryx*, Lydekker 1906). *Res. Vet. Sci.*, 20: 122-126.
- STEWART, C. B. 1993. The powers and pitfalls of parsimony. *Nature*, 361: 603-607.
- TELFORD III, S. R.; GORENFLOT, A.; BRASSEUR, P. & SPIELMAN, A. 1993. Babesial infections in man and wildlife. In: KREIER, J. P. *Parasitic Protozoa*. 2nd edition, Vol. 5. Academic Press, New York. p. 1-47.
- THOMAS, S. E.; WILSON, D. E. & MASOM, T. E. 1982. *Babesia*, *Theileria* and *Anaplasma* spp infecting sable antelope, *Hippotragus niger* (Harris, 1838), in Southern Africa. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 49: 163-166.

- UILENBERG, G. 1995. International collaborative research: Significance of tick-borne hemoparasitic diseases to world animal health. *Vet. Parasitol.*, 57: 19-41.
- UILENBERG, G.; FRANSSSEN, F. F. J. & PERIÉ, N. M. 1987. Relationships between *Cytauxzoon felis* and African piroplasmids. *Vet. Parasitol.*, 26: 21-28.
- WAGNER, J. E. 1976. A fatal cytauxzoonosis-like disease in cats. *JAVMA.*, 168(7): 585-588.
- WAGNER, J. E.; KIER, A. B. & MOREHOUSE, L. G. 1976. Feline cytauxzoonosis: A newly reported blood protozoan disease from Southwestern Missouri. *Missouri Vet.*, 26(2): 12-13.
- WAGNER, J. E.; FERRIS, D. H.; KIER, A. B.; WIGHTMAN, S. R.; MARING, E.; MOREHOUSE, L. G. & HANSEN, R. D. 1980. Experimentally induced cytauxzoonosis-like disease in domestic cats. *Vet. Parasitol.*, 6: 305-311.
- WALKER, D. B. & COWELL, R. L. 1995. Survival of a domestic cat with naturally acquired cytauxzoonosis. *JAVMA.*, 206(9): 1363-1365.
- WEHINGER, K. A.; ROELKE, M. E. & GREINER, E. C. 1995. Ixodid ticks from panthers and bobcats in Florida. *J. Wildlife. Dis.*, 31(4): 480-485.
- WIGHTMAN, S. R.; KIER, A. B. & WAGNER, J. E. 1977. Feline cytauxzoonosis: Clinical features of a newly described blood parasite disease. *Feline Pract.*, May: 23-26.
- WILSON, D. E.; BARTSCH, R. C.; BIGALKE, R. D. & THOMAS, S. E. 1974. Observations on mortality rates and disease in roan and sable antelope on nature reserves in the Transvaal. *J. South Afr. Wildlife Manag. Assoc.*, 4: 203-206.
- WITOLA, W. H. & LOVELACE, C. E. A. 2001. Demonstration of erythrophagocytosis in *Trypanosoma congolense*-infected goats. *Vet. Parasitol.*, 96: 115-126.
- WOLTERS, K. 1991. The troublesome parasites: molecular and morphological evidence that Apicomplexa belong to the dinoflagellate-ciliate clade. *BioSystems*, 25: 75-83.
- WOESE, C. R. 1981. Archaeobacteria. *Sci. Am.*, 244(6): 98-122.
- WOESE, C. R. 1994. There must be a prokaryote somewhere: microbiology's search for itself. *Microbiol. Rev.*, 58(1): 1-9.

XIAO, L.; ESCALANTE, L.; YANG, C.; SULAIMAN, I.; ESCALANTE, A. A.; MONTAL, R. J.; FAYER, R. & LAL, A. A. 1999. Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65(4): 1578-1583.

ZAR, J. H. 1999. *Biostatistical Analysis*. 4th edition. Prentice Hall, New Jersey. 663p.

ZINKL, J. G.; McDONALD, S. E.; KIER, A. B.; CIPPA, S. J. & SMALL, P. J. 1981. *Cytauxzoon*-like organisms in erythrocytes of two cheetahs. *JAVMA.*, 179(11): 1261-1262.

YOUNG, A. S.; GROOTENHUIS, J. G.; LEITCH, B. L. & SCHEIN, E. 1980. The development of *Theileria* = *Cytauxzoon taurotragi* (Martin and Brocklesby, 1960) from eland in its tick vector *Rhipicephalus appendiculatus*. *Parasitol.*, 81: 129-144.