

MEMÓRIAS
DO
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Tomo 54

Fascículo 2

Outubro de 1956

**Estudo sôbre hemoparasitos de *Bufo marinus*
L. da Venezuela¹**

1. Hemogregarinas -- 2. Uma nova espécie de *Toxoplasma*

José Vicente Scorza, Cecilia Dagert B. e Luís Iturriza Arocha
Escola de Ciências. Universidade Central da Venezuela

(Com 4 figuras no texto e 3 estampas)

1 — HEMOGREGARINAS

O estudo dos protozoários do tipo das hemogregarinas, em batráquios da região neotrópica, inicia-se com as observações de DURHAM (1902), que comprovou a presença destes protozoários em sapos do Pará.

DARLING (1912) encontrou uma hemogregarina em *Bufo marinus* L. do istimo do Panamá, sem conseguir, contudo, observar as fases evolutivas deste parasito em *Amblyomma varium*, que parasitavam os sapos infestados. LEGER (1918a) descreve a *Haemogregarina cayenensis*, em sapos da Guiana Francesa, comparando o seu parasito com os encontrados no mesmo Continente e, mais tarde (1918b), descreve a *Haemogregarina darlingi* e outra espécie, a *Haemogregarina* sp., que compara com a *H. minima* Chaussat, cujo estudo, feito por NÖLLER (1913), a havia separado do gênero *Haemogregarina*, no sentido proposto por DANILEWSKY em 1885. PHISALIX (1930) descreve *H. aquai*, em sapos procedentes da Guiana.

Sendo *B. marinus* L. o sapo mais comum das regiões baixas da Venezuela (abaixo de 1 200 metros), propusemo-nos investigar a presença de esporozoários deste tipo em exemplares venezuelanos, sendo o objeto desta comunicação expor os resultados a que chegamos, o achado de 3 espécies de *Haemogregarina* e uma de *Toxoplasma*, a cujo estudo dedicaremos a 2.^a parte deste trabalho.

¹ Pesquisa realizada no laboratório particular dos autores.
Recebido para publicação a 3 de março de 1956.
Tradução de M. Prieto da Silva.

TÉCNICA EMPREGADA

Capturamos mais de 600 exemplares adultos e jovens de *B. marinus* L., dos dois sexos, procedentes das seguintes localidades: Distrito Federal, Estados de Anzoátegui, Apure, Aragua, Falcón, Guárico, Miranda, Monagas, Yracuy e Território Federal do Amazonas, que cobrem áreas representativas das zonas montanhosas da Cordilheira da Costa, das planícies e da Guiana. Durante o período de observações alimentamos os animais em estudo, com pedaços de fígado cru de bovinos.

Para o exame periódico a que procedemos, extraímos-lhes o sangue seccionando a veia lingual e a artéria maxilar interna, que examinamos a fresco, por contraste de fase, pela coloração supravital com sulfato de azul de Nilo em solução isotônica e em esfregaços corados pelo Giemsa e com hematoxilina férrica. Encontrando um animal muito parasitado, com abundantes protozoários no sangue, tiramos amostras das diferentes regiões do tubo digestivo, pulmões, coração, rim, gonadas, encéfalo, pâncreas, fígado e vesícula biliar, baço e medula óssea.

Fixamos amostras destes órgãos em Bouin, formol neutro e Zenker para corar secções de 5μ , pelas técnicas usuais de Cole, Weigert, Heidenhain, Mallory fosfotungstenico, tricrômico de Gomori, Feulgen e Giemsa, tendo obtido ótimos resultados para a coloração dos parasitas, com o método de Mallory, modificado por PEERS (1941).

RESULTADOS

Haemogregarina aquai Phisalix 1930

Bull. Soc. Path. exot. 23 : 372-377

Encontramo-la em uma fêmea adulta, capturada no Jardim Botânico da cidade de Caracas.

Sistemáticamente, de 4 de janeiro de 1955 a fins do mesmo ano, examinamos o sangue deste animal observando uma descontinuidade no aparecimento de esquizoites livres e móveis, produzindo-se, de 4 em 4 dias, uma explosão de formas finas, ao passo que as formas quísticas intraglobulares aumentavam progressivamente.

Formas extraglobulares — Falciformes ou alongadas, com movimento vermióide; extremidade anterior adelgada e provida de um apêndice filiforme ou lanceolado, mediante o qual se introduz nos eritrocitos.

Extremidade posterior, aguçada. Núcleo em forma de massa compacta, entre o terço médio e o posterior. Comprimento médio: $18,7\mu$; largura: $1,97\mu$; comprimento do núcleo $8,1\mu$.

Formas intraglobulares — Reniformes, providas ou não de membrana quística. Nas recentemente enquistadas, o filamento anterior transforma-se em estrutura epimeridióide, semelhante à que se observa na *Haemogregarina ranarum*; extremidade posterior dobrada e colocada a um lado do corpo do parasito, como na *Haemogregarina najae*; em 70% dos casos, observa-se um duplo parasitismo nos eritrocitos, sem que

se note deformação do eritrocito, mesmo quando o núcleo está deslocado para uma das margens. Nesta fase, os parasitos medem $10,6\mu$ de comprimento, por $3,06\mu$ de largura, apresentando um núcleo compacto.

Pelo fato de possuímos um único animal parasitado, foram muito limitadas as nossas pesquisas para a obtenção de formas de divisão esquizogônica.

Do exame de numerosos cortes, tratados por vários métodos, podemos concluir, com reserva, que a esquizogonia desta espécie não é tão conspícua como em outras espécies de Hemogregarinas de batráquios americanos, cujo tipo de multiplicação agâmica foi brilhantemente estudada por DA CUNHA e MUNIZ (1927) no caso da *Haemogregarina leptodactyli*, parasita do *Leptodactylus ocellatus*. Realmente, só encontramos estruturas que possam ser consideradas como formas de multiplicação, no pulmão e no fígado, para a esquizogonia dos arozoitos, e no baço para a dos gametocitos.

Em ambos os casos, estes processos observam-se na células endoteliais, como acontece nos capilares pulmonares e sinusóides hepáticos, em que a divisão chega a formar 6 merozoitos esféricos, compactos e punctiformes que, ao amadurecer, ficam envoltos em uma cápsula quística (figs. 1 e 2).



Fig. 1



Fig. 3

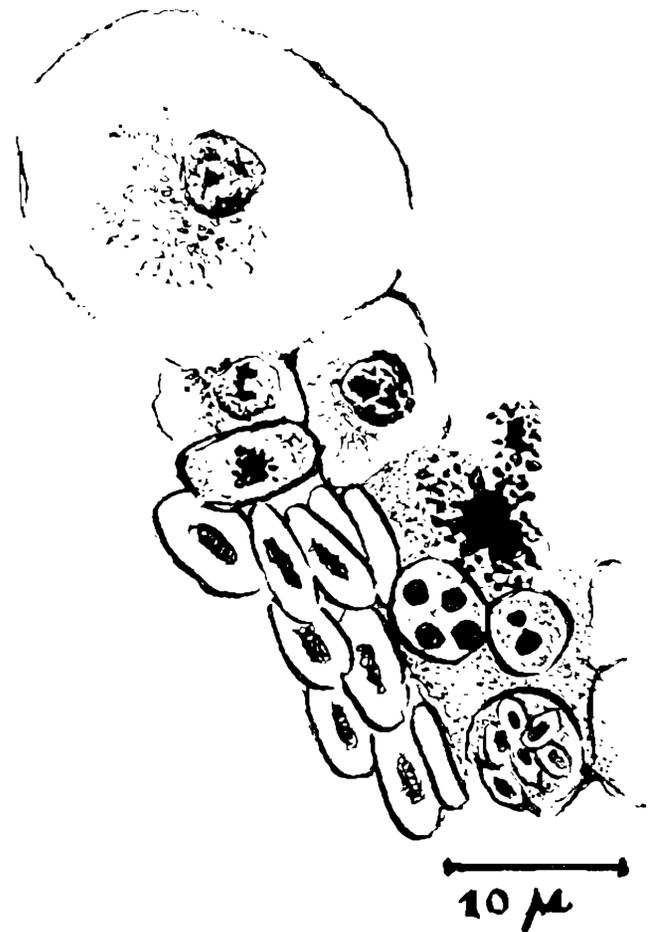


Fig. 2

No caso de esquizogonia esplênica, o processo parece terminar pela formação de 12 esquizoitos que, ao passarem para os capilares, dão origem às formas já descritas (fig. 3). A confirmar-se esta observação, *Haemogregarina aquai* Phisalix, passaria, automaticamente, a ser *Karyolysis aquai* (Phisalix), uma vez que o gênero *Karyolysis* Labbé, neste tipo de protozoários, realiza a sua esquizogonia nas células endoteliais.

Haemogregarina Legeri nov.sp.

Haemogregarina sp. Leger 1918, Bull. Soc. Path. exot. 11(9) : 788.

Esta forma, vista originalmente por LEGER em *Bufo marinus* L. da Guiana Francesa, foi, pelo seu descobridor, identificada como forma muito parecida à *Haemogregarina minima* (Chaussat) que, como dissemos, tinha sido incluída neste gênero, por NÖLLER (*op. cit.*), ao estudar a esquizogonia da denominada *Kesterella minima* Chaussat 1850.

Encontramos esta espécie em sapos procedentes do Distrito Federal, em sangue periférico, como formas extraglobulares e intraglobulares, surpreendendo, *in vivo* e depois de coradas pelo Giemsa, as transformações que se operam desde a forma livre até à quística (fig. 4).

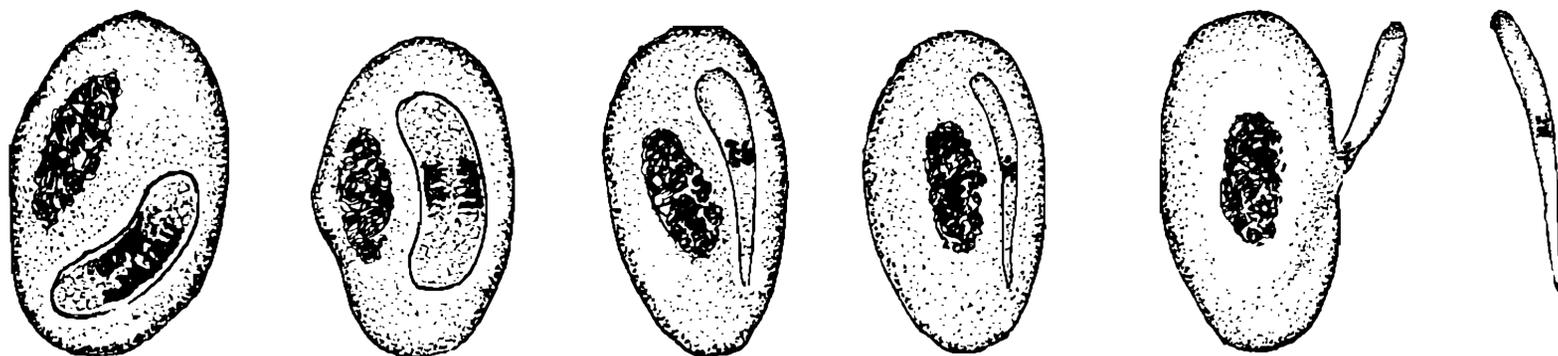


Fig. 4

Formas extraglobulares — As formas extraglobulares, examinadas a fresco, exibem ativo movimento vermioide, com a extremidade mais aguçada dirigida para a frente e com a posterior, arredondada. Núcleo no terço médio. Não se observam diferenças de tamanho entre os merogamontes masculinos e femininos, notando-se tão somente, um dimorfismo nuclear: as formas femininas possuem núcleo integrado por 4 a 6 grânulos de cromatina, dispostos gregariamente, ao passo que as formas que consideramos masculinas possuem um núcleo difuso, constituído por granulações dispersas. As formas masculinas medem $12,95\mu$, enquanto que as femininas têm $11,9\mu$.

Formas intraglobulares — Reniformes, com extremidades arredondadas; deformam o eritrocito e deslocam-lhe o núcleo. Os gametocitos masculinos medem $8,4\mu$ de comprimento por $3,5\mu$ de largura, apresentando um núcleo difuso, muito disperso que abrange a largura do parasito e mede $6,3\mu$ de comprimento. Os femininos, algo maiores, medem $11,2\mu$ de comprimento por $4,2\mu$ de largura, com um núcleo vesicular que mede $4,2\mu$ de comprimento.

Difere esta espécie, da *H. minima* (Chaussat), pela forma dos gamontes e pelo tamanho e estrutura dos gametocitos.

Haemogregarina darlingi Leger 1918

Bull. Soc. Path. exot. 11(9) : 788.

É esta a espécie mais cosmopolita do país e é tão freqüente o seu aparecimento que, não só estudamos a sua morfologia no sangue, mas

ainda o seu desenvolvimento esquizogônico, além dos possíveis mecanismos de transmissão através de prováveis vectores.

No sangue periférico dos animais infestados, o parasito apresenta-se exclusivamente sob o aspecto de quisto, parasitando os glóbulos em forma simples ou dupla.

Em todos os casos, o parasito desloca o núcleo do eritrocito, embora só em 50% dos casos altere a forma dos mesmos, situando-se no seio do citoplasma sem provocar alteração mediante os métodos usuais de coloração.

O parasito apresenta a forma de feijão com ambas as extremidades arredondadas; envolto por membrana que resiste à coloração; o citoplasma apresenta-se finamente vacuolado e com núcleo frouxo que ocupa o médio do mesmo. Distinguimos 2 tipos de formas bem características: difuso, 7,26 μ de comprimento e 3,48 μ de largura e outras, os gametocitos femininos, com núcleo granular mui compacto, medindo 8,98 μ de comprimento, por 4,45 μ de largura.

A pesquisa do parasito em diferentes órgãos do animal, levou-nos ao estudo minucioso dos cortes de baço, fígado e rim, preparados por inclusão em parafina e coloridos pelos métodos já expostos, incluindo, ainda, a medula óssea, tratada pelo Giemsa. A única forma de divisão que observamos foi a esquizogonia que se realiza na medula óssea, fígado e baço, apresentando-se, esta última víscera, muito parasitada, sem exhibir sinais de aparente alteração estrutural, a não ser uma leve hipertrofia. Todos os outros órgãos se apresentaram indenes.

A esquizogonia é dupla, realizando-se nas mencionadas vísceras, de preferência no baço. Um ciclo leva à formação de 32 a 64 merogametocitos, isto é, a merozoitos que passam aos capilares e invadem os glóbulos vermelhos para se enquistarem e darem origem aos gametocitos.

Eventualmente as formas jovens desta fase podem abandonar os glóbulos e aparecer como quistos "livres". O outro ciclo leva à formação de 4 a 8 merozoitos ou esquizozoitos que, brotando do quisto, invadem as células esplênicas vizinhas, reiniciando novas esquizogonias.

Este ciclo compreende as formas representadas nas fotomicrografias 1-7 (Est. 1) e inicia-se com a forma jovem do trofozoito incluído dentro de uma membrana quística que a separa das células vizinhas; tem citoplasma areolar e núcleo compacto. Por divisões nucleares sucessivas, o parasito adianta a esquizogonia (figs. 2 a 7), aumentando o volume do citoplasma, dispondo-se os núcleos na periferia da massa central do citoplasma. Durante o processo da esquizogonia, que dá origem a merogametocitos, o quisto aumenta gradualmente de tamanho. O trofozoito uninucleado, indiviso, tem forma esférica e mede 10,08 μ de diâmetro; após a primeira divisão, o tamanho aumenta ligeiramente até 11,25 μ , apresentando-se um par de núcleos polares, separados por citoplasma areolar, muito refringente. O quisto tetranuclear mede 12,8 μ e apresenta citoplasma mais homogêneo e menos vacuolar; fenômeno êste que se acentua até o quisto atingir 29,79 μ no diâmetro maior, em forma ovóide. Nesta fase, o quisto apresenta divisão citoplástica pouco perceptível, com os núcleos dos merogametocitos, paralelamente nos

polos do quisto, deixando, entre si, massa de citoplasma fracamente basófilo. Os primeiros gametocitos intraquísticos medem $5,16\mu$ de comprimento, por $1,36\mu$, na maior largura, em sua parte média. A esquizogonia, que origina os merozoitos, inicia-se, ao que parece, com a mesma forma uninucleada que descrevemos no ciclo anterior; difere daquela porque, uma vez concluída a anáfase nuclear, o citoplasma divide-se em numerosos merozoitos estreitamente emparelhados. Cada merozoito mede $7,56\mu$ de comprimento por $3,36\mu$ de largura. Dividindo-se o núcleo de cada um deles, forma-se um quisto de $14,7\mu$ que aloja 4 parasitos. Dividindo-se, de novo, cada merozoito, forma-se um quisto que não ultrapassa um diâmetro de 15μ e aloja 8 merozoitos de $8,4\mu$ de comprimento por $2,94\mu$ de largura (Est. 1, figs. 8-9).

Procurando estudar o mecanismo de transmissão deste parasito, capturamos, nas vizinhanças do lugar onde foram encontrados os sapos infestados, diferentes tipos de artrópodos vulnerantes, especialmente carrapatos (*Amblyomma* sp.) que, em diversas fases de desenvolvimento, encontramos fixados nos batráquios; o estudo cuidadoso de esfregaços de órgãos deste aracnídeo, separados por dissecação ou mediante exame de cortes seriados dos mesmos, não revelou a presença de formas parasitadas no magma digerido, nem nas células amebocitárias que o contém.

Tendo notado que nos sapos muito jovens se podiam encontrar fases muito avançadas do parasito, pensamos que o vector poderia encontrar-se na água e infestar os batráquios no curso de sua metamorfose. Com este fim, examinamos cortes seriados de hirudíneos (*Glossosiphonia* sp.), que encontramos alimentando-se em sapos infestados, e os mantivemos em nosso laboratório, durante dois meses, tentando, com eles, um xenodiagnóstico, mediante comida, de 6 em 6 dias. O exame minucioso de cortes seriados sagitais e transversais, demonstrou a existência de fases muito prematuras de excisão entre gametocitos, acompanhadas de fenômenos de maturação nuclear, cujos detalhes, bem como a evidência experimental do papel vector deste parasito, estamos estudando.

2 — UMA NOVA ESPÉCIE DE *TOXOPLASMA*

A partir do momento em que iniciamos nossa investigação, surpreendeu-nos a presença de um parasito intraglobular, perfeitamente falciforme, com uma extremidade afilada e outra romba, apresentando um citoplasma azulado ao Giemsa e um núcleo muito pequeno, vesicular e vermelho. A pesquisa da multiplicação nos órgãos parasitados, levou-nos à noção de que este parasito não se reproduz por esquizogonia, mas por divisão binária. Um estudo minucioso do parasito e a comparação deste com as formas descritas com *Toxoplasma gondii* Nicolle & Manceau, 1909, *Encephalitozoon cuniculi* Levaditi & Cols, 1924, *Soroplasma* de Bonfiglio (1923-24) e diversas formas de sarcosporídeos, levou-nos à identificá-lo como sendo uma forma de *Toxoplasma*.

A existência destes parasitos em vertebrados poikiloterms tornou-se evidente como resultado de variadas pesquisas; YAKIMOFF (1926) descreveu *T. wassilenwsky* de *Abramis* sp., um teleósteo. Em répteis descreveram-se outras 4 espécies; num sáurio, a *Iguana tuberculata* de Trinidad, *T. brumpti* Coutelen (1932) e, em ofídeos, *T. plimmeri* (Plimmer) 1916, *T. colubri* Tibaldi (1921), *Toxoplasma* sp. Shortt (1950).

Até a presente data não se havia observado *Toxoplasma* em batráquios e, por esta razão, daremos mais ênfase à descrição deste parasito.

Formas sanguícolas — Os animais parasitados são de diversas procedências; em todos os casos a infecção foi diagnosticada mediante o exame de sangue a fresco, colorido com azul Nilo ou simplesmente com o emprêgo do contraste de fase. O protozoário apresenta-se, no sangue recém-extraído, intraglobular e geralmente polar ao núcleo do eritrócito sem deformar o glóbulo. Ocasionalmente, podem observar-se 2 parasitos no mesmo glóbulo, caso em que se produz uma leve hipertrofia da célula sangüínea. O protozoário apresenta extremidade anterior aguçada e posterior arredondada e mais larga, com um núcleo granular situado no terço posterior ou entre este e o terço médio. O seu comprimento médio é de $9,10\mu$ por $3,25\mu$, na parte mais larga. Salvo a presença do parasito, cuja espessa membrana torna difícil a coloração pelos métodos usuais, o resto do glóbulo não apresenta alteração alguma (Est. 2, fig. 1).

Em sangue extravasado e incoagulado por citrato ou oxalato, os parasitos abandonam os glóbulos e pode observar-se, então, um deslocamento dos mesmos, em direção espiriloide, com a extremidade adelgada para a frente. Estas formas extraglobulares tratadas por hematoxilina férrica, mostram um núcleo vesicular situado no terço médio e 2 corpúsculos polares, mais densos e esféricos, as vezes maiores que o núcleo. Estes corpúsculos não se coram pelo reativo de Feulgen, não sendo, portanto, constituídos por substância nuclear, ao contrário do que acontece com o corpúsculo médio do parasito (Est. 2, fig. 2).

Formas viscerais — Só mediante técnicas de coloração regressiva pela hematoxilina de Heidenhain e de Mallory, podem ser observados os parasitos, nos órgãos onde se apresentam.

Examinamos diversos órgãos e só encontramos parasitos no baço, fígado, rim e encéfalo. Em todos os casos, o parasito aparece formando grandes aglomerados (nidos) de até 500 indivíduos. Sendo pequenas as diferenças de aspecto dos protozoários, nos órgãos em que se apresentam, vamos descrevê-los em cada um deles, advertindo que a descrição é feita à base do exame de cortes de 5 a 6μ de espessura.

Formas esplênicas — Falciforme ou ovóide, provido de uma cápsula refringente, perceptível pelo contraste de fase ou por meio de coloração intensa. O espaço capsular é amplo e o parasito ocupa metade dele. O comprimento é variável, com a média de $5,20\mu$ de comprimento, por $1,62\mu$ de largura; apresenta uma extremidade aguçada e outra arre-

dondada, núcleo na parte média, punctiforme e compacto, raramente de estrutura granular; paranucleares, nos dois lados, esféricos e iguais ao núcleo em tamanho, ocupando, geralmente, a largura do parasito e apresentando-se uniformemente coloridos (Est. 2, fig. 3).

Nos parasitos muito jovens, formados por divisão binária, os 3 corpúsculos confundem-se em uma massa alongada que, posteriormente, se separa em seus elementos. Em alguns casos, por secção transversal, o parasito apresenta-se com aspecto cilíndrico, com núcleo central.

Quistos — Nota-se uma grande variedade, quer no tamanho, quer na composição dos aglomerados parasitários.

As formas em divisão só se conseguem nos pequenos aglomerados e nas partes em que o órgão aparenta estar intacto; neste caso os parasitos apresentam-se irregularmente distribuídos, enchendo totalmente o citoplasma da célula parasitada, sendo muito difícil individualizar as formas, o que proporciona uma falsa imagem de esquizogonia. O núcleo da célula parasitada, central nesta etapa, não manifesta alteração alguma, sendo, apenas, ligeiramente menor que as células indenes. À medida que os parasitos crescem, vão se individualizando e o citoplasma da célula hospedeira hipertrofia-se, à proporção que os protozoários aumentam de tamanho. Cada parasito individualiza-se pela presença de uma cápsula que o separa dos vizinhos e, tanto o volume desta cápsula como a profusão dos parasitos, conferem aspecto hialino ao citoplasma, que apresenta múltiplos vacúolos. Consideramos como uma espécie de quisto, os aglomerados parasitários, isto é, como um pseudoquisto a célula hipertrofiada com os seus parasitos individualizados nas respectivas cápsulas. O número de parasitos é, geralmente, elevado, podendo chegar, nos quistos, até 50 por pseudoquisto.

A infecção neste órgão é intensa, abrangendo 80% da massa visceral. O agregado de pseudoquistos apresenta, geralmente, forma esférica e seus contornos determinam-se pela pressão que exercem sobre as células do parenquima esplênico, circumvizinho, as quais se dispõem em forma de cápsula, para cada aglomerado parasitário. Em outros casos, o quisto segue o trajeto das trabéculas, ramificando-se e estendendo-se por entre os nódulos esplênicos (Est. 2 fig. 4).

Formas hepáticas — A característica da lesão, neste órgão, é a forma irregular dos quistos, dispostos geralmente ao nível dos espaços de Kiernan, ou, então, formando focos menores, que obstruem o trajeto dos sinusóides. Casos há, em que se observam infiltrações linfocitárias que, praticamente, circunscrevem os quistos, nas quais, se observa um acúmulo de pigmento pardo, disposto irregularmente, com aspecto de hemosiderina. O número de parasitos, nestes quistos, é reduzido e as cápsulas parasitárias acham-se separadas pelo pigmento pardo que se dispõe em forma de trabéculas. O resto do parenquima hepático apresenta aspecto normal (Est. 3, fig. 1).

Formas renais — O parasito, neste caso, distribui-se compactamente, tanto na zona glomerular, como na medular, adotando 2 formas bem definidas, focos esféricos de limites muito precisos, situados nos espaços interglomerulares e com um extenso infiltrado, que segue trajeto dos túbulos, formando acúmulos (que promovem o colapso dos condutos), ou lhes interrompem os trajetos. Cada foco é formado por uma teia de conjuntivo frouxo, com infiltrado histiocitário, na qual se encontram os parasitos, cuja morfologia é idêntica à descrita para os protozoários do baço. Nunca observamos parasitos na luz tubular, mesmo quando destruídos pela presença de focos, na zona intertubular (Est. 3, fig. 2).

Formas em divisão — As formas em divisão só são encontradas em quistos em formação. A célula parasitada, normalmente de tipo reticulo-histiocitário, é de tamanho normal e os parasitos dispõem-se no seu citoplasma, em forma de pequenos bastonetes que, coloridos pelo Feulgen ou com hematoxilina de Heidenhain e observados com o contraste de fase, apresentam formas em divisão binária ou estádios emparelhados com os protozoários estreitamente unidos, em direção paralela aos respectivos eixos. Com o crescimento dos parasitos, altera-se esta distribuição regular, apresentando-se desordenada (Est. 3, fig. 3).

Anatomia patológica dos órgãos parasitados — À vista desarmada, não existe maior evidência de parasitismo nos órgãos. O baço, levemente hipertrofiado, mantém forma esferóide, cápsula lisa e consistência mole; não apresenta nenhuma alteração ao corte, não obstante estar intensamente parasitado. O fígado, ao contrário, apresenta-se hipertrofiado e duro; os pulmões, encéfalo e demais órgãos têm aspecto normal.

Ao microscópio, o baço apresenta-se inteiramente atingido; focos parasitários substituem os nódulos e apenas a cápsula se mantém intacta.

Os focos são esféricos e grandes, atingindo, por vezes, até 0,5 mm de tamanho e, em certos casos, são tão numerosos que coalescem, dando a impressão de uma infiltração parasitária extensa e difusa. A área ocupada pelos focos é clara, levemente colorida pela eosina e pobre em núcleos. Em muitos casos, cada pseudoquisto se acha rodeado por uma massa de linfocitos grandes, com núcleos normais; noutros, porém, não se observam reações inflamatórias, linfocitárias ou leucocitárias. Também não observamos eosinófilos nem células basofílas (células cevadas). No fígado, os pseudoquistos são menores que os do baço, distribuindo-se sem regularidade, embora, em alguns casos, ocupem os espaços de Kiernan. Ao contrário do que se observa no baço, dão-se, no fígado, três alterações características: uma grande quantidade de pigmento pardo, muito semelhante à hemosiderina, uma destruição de eritrócitos e a presença de macrófagos, no próprio seio dos focos.

Persiste, em torno de alguns grupos de parasitos, a acumulação de linfocitos, com tendência a gruparem-se em um único ponto, ao lado do foco parasitário e em seu próprio seio, entre os parasitos. Grumos de

hemosiderina e um ou outro macrófago, contendo um ou vários parasitos, aparecem isoladamente. No mais, o resto do órgão está, aparentemente, normal. No rim, a lesão mais importante é a obstrução dos túbulos e a supressão da permeabilidade dos mesmos pela implantação dos aglomerados (ninhos) parasitários.

Discussão — Até o momento, passa de setenta o número de parasitos encontrados pertencentes ao gênero *Toxoplasma*, sendo, cêrca de 25 em mamíferos, mais de quarenta em aves, quatro em répteis e um em um teleósteo. Conhecem-se trinta denominações específicas, sendo 26 para homeotermos e 4 para poikilotermos. Sôbre a validade destas espécies, CHATTON e BLANC (1917) consideram êstes parasitos como eurixenos, isto é, expressam uma tese unicista, consideração esta que logo foi corroborada pela descoberta de propriedades imunológicas comuns a animais diferentes, parasitados em presença de um antígeno preparado com um *Toxoplasma* isolado de um caso humano. Reforçando esta tese, SABIN e FELDMAN (1948) introduziram um método diagnóstico, baseado numa reação com azul de metileno, que consideraram exclusiva para o diagnóstico da toxoplasmose e na qual MÜHLPFORDT (1951) encontrou reação de grupo com sarcosporídeos.

De acôrdo com a tese unicista, tôdas as espécies descritas são, apenas, *T. gondii*. No que respeita às espécies encontradas em vertebrados, especialmente poikilotermos, não pode, esta tese, estender-se com facilidade, em face da discordância nos resultados obtidos ao intentar inocular vertebrados de sangue frio com amostras de *Toxoplasma* provenientes de vertebrados homeotermos. SPLENDORE (1913a e 1913b) parece ter conseguido resultados positivos, em inoculações de sáurios e batráquios, com *T. cuniculi*, por via intraperitoneal e intramuscular. MANWELL e cols. (1952) tentaram inocular, por diferentes vias, 5 rãs com uma amostra humana, incluindo a via intracerebral sem, contudo, obter resultados positivos; mais recentemente, KOZAR (1952) refere idênticos resultados ao inocular setenta rãs com uma amostra de *T. gondii*, e COUTELEN e cols. (1952), num esforço por consegui-lo, inoculam, por diferentes vias, 27 exemplares de peixes, 14 de anfíbios e 10 de répteis, com uma amostra de origem humana, muito virulenta, sem alcançarem o objetivo colimado. Êstes mesmos autores discutem os resultados, emitindo 2 opiniões: ou se trata de 2 espécies boas, uma de homeotermos, inoculável, reciprocamente entre aves e mamíferos, e outra de poikilotermos, cujo estudo, entre vertebrados de sangue frio, ainda não foi possível fazer; ou, então, trata-se de uma só espécie, dificilmente inoculável, de homeotermos a poikilotermos.

Diante desta circunstância e tendo à nossa disposição vários exemplares de *Bufo marinus* L. naturalmente infestados com esta espécie de *Toxoplasma*, reservaremos as conclusões resultantes desta pesquisa para posterior publicação; entretanto, propomos que a espécie seja denominada *Toxoplasma Serpai* nov. sp., dedicando-a ao grande amigo, Dr. LUÍS MARIANO SERPA SANABRIA.

RESUMO

Faz-se uma revisão das espécies de *Haemogregarina*, encontradas, até a presente data, em *Bufo marinus* L. da região Norte, Leste e Sul da Venezuela, descrevendo-se o ciclo agâmico da *Haemogregarina darlingi* Leger, 1918, o ciclo esquizogônico da *Haemogregarina aquai* Phisalix 1930, propondo-se seja denominada *Karyolysus aquai* (Phisalix) por realizar o ciclo agâmico nas células endoteliais. Descreve-se a *Haemogregarina legeri* nov. sp.

Estuda-se um *Toxoplasma* no sangue e vísceras de *Bufo marinus* L., descrevendo-se a anatomia patológica dos órgãos afetados, discutindo-se o estado atual da sistemática das espécies de *Toxoplasma*, parasitos de vertebrados poikilotermos, propondo-se o nome de *Toxoplasma serpai* nov. sp. para este protozoário.

RESUMEN

Se hace una revisión de las especies de *Haemogregarina* encontradas hasta el presente en *Bufo marinus* L. de la región neotropical, estudiando estos parásitos en sapos del centro, norte, oriente y sur de Venezuela, describiendo el ciclo agámico de la *Haemogregarina darlingi* Leger 1918, el ciclo esquizogónico de la *Haemogregarina aquai* Phisalix 1930, proponiendo denominarla *Karyolysus aquai* (Phisalix) por realizar su ciclo agámico en las células endoteliales. Se describe la *Haemogregarina legeri* nov. sp.

Se estudia un *Toxoplasma* en la sangre y vísceras de *Bufo marinus* L., describiendo la anatomía patológica de los órganos afectados, discutiéndose el estado actual de la sistemática de *Toxoplasma* parasitos de vertebrados poikilotermos, proponiendo el nombre de *Toxoplasma serpai* nov. sp. para este protozoario.

SUMMARY

A revision is made of the species of *Haemogregarina* found up to now in *Bufo marinus* L. from the Neotropical Region. Parasites in toads from the north, center, south and east of Venezuela are studied and descriptions are made of the agamic cycle of *Haemogregarina darlingi* Leger 1918; the schizogonic cycle of *Haemogregarina aquai* Phisalix 1930, proposing reclassify it as *Karyolysus aquai* (Phisalix) since its agamic cycle is carried through in endothelial cells, and *Haemogregarina legeri* nov. sp.

A *Toxoplasma* is studied in the blood and viscera of *Bufo marinus* L. describing the pathology of affected organs, proposing the name *Toxoplasma serpai* nov. sp. for it. The actual state of the systematics of *Toxoplasma* parasites in poikilotherm vertebrates is discussed.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird eine Revision von den bisher in *Bufo marinus* L. gefundenen *Haemogregarina*-Arten in der neotropischen Region zusammengefasst. Die genannten Parasiten wurden in den Kröten der zentralen, nördlichen, östlichen und südlichen Venezuela studiert. Der agamische Zyklus von *Haemogregarina darlingi* Leger 1918 und der schizogonische Zyklus von *Haemogregarina aquai* Phisalix 1930 wurde beschrieben, was als *Karyolysus aquai* (Phisalix) zu nennen vorgeschlagen wurde, da er seinen agamischen Zyklus in endotelialen Zellen vollbringt. Man beschreibt *Haemogregarina legeri* sp. n.

Man erforscht ein *Toxoplasma* im Blut und Eingeweiden von *Bufo marinus* L., beschreibend die pathologische Anatomie der befallenen Organen, erörternd den jetzigen Zustand über Systematik der *Toxoplasma*-Parasiten von poikolithermen Wirbeltieren. Es wird der Name *Toxoplasma serpai* sp.n. für den genannten Einzeller vorgeschlagen.

BIBLIOGRAFIA CITADA

- BONFIGLIO, F. 1923-1924. Una malattia spontanea dei centri nervosi del coniglio. (Encephalite infiltrativa non purulenta). Boll. 1. Acc. Med. di Roma, 50 : 30.
- COUTELEN, F. 1932. Existence des toxoplasmes chez les lacertiliens. Un Toxoplasme nouveau chez un Iguane de la Trinité. C. R. Soc. Biol., 110 : 885.
- CUNHA, A.M. da & J. MUNIZ, 1927. Sur le cycle endogene d'*Hemogregarina leptodactyli* Lessage 1908 (*Karyolysus*?). Comp. Rend. Soc. Biol. 97 : 1351.
- CHATTON, E. & G. BLANC, 1917. Notes et reflexions sur le toxoplasme et la toxoplasiose du Gondi. Arch. Inst. Past. Tunis. 10 : 1.
- DARLING, S. T. 1912. Some blood parasites (*Haemoproteus* and *Haemogregarines*). Bull. Soc. Path. exot. 5(2) : 71.
- DURHAM, F. 1902. Report of Yellow Fever Expedition to Para 1900. Liverpool School of Trop. Med., Mem. VII: 78.
- LEGER, M. 1918a. *Hemogregarines* de *Bufo marinus* L. Bull. Soc. Path. exot. 11(8) : 687.
- LEGER, M. 1918b. *Hemogregarines* de crapauds à la Guyane Française. Bull. Soc. Path. exot. 11(9) : 788.
- LEVADITI, C., S. NICOLAU & R. SCHOEN. 1924. L'étiologie de l'encephalite epizootique du lapin, dans ses rapports avec l'étude expérimentale de l'encephalite letargique. *Encephalitozoon cuniculi* (nov. spec.). Ann. Inst. Pasteur, 43 : 673.
- MÜHLFORDT, H. 1951. Das Verhalten *Sarcosporidien*-infizierter Tiere im Sero-Farbstest nach Sabin-Feldman. Z. Tropenmed. Parasit. 3 : 205.
- NICOLLE, CH. & L. MANCEAUX, 1909. Sur un protozoaire nouveau du Gondi. C.R. Acad. Sci. 148 : 369.
- NÖLLER, W. 1913. Die Blutprotozoen des Wasserfroches und ihre Übertragung. I Teil. Arch. Protist. 31 : 169.

- PEERS, J. H. 1941. A modification of Mallory's phosphotungstic acid hematoxylin stain for formaldehyde-fixed tissue. *Arch. Path.* 32 : 446.
- PHISALIX, M. 1930. Les Hemogregarines du *Bufo aquai* Latr. (Syn. *Bufo marinus* L.). *Bull. Soc. Path. Exot.* 23 : 372.
- PLIMMER, H. G. 1916. Notes on the genus *Toxoplasma* with a description of three new species. *Proc. Roy. Soc.* 89 : 291.
- SHORTT, H.E. 1950. Typical *Toxoplasma* found in the blood of a tree snake, *Thelotornis kirtlandii*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 43 : 351.
- YAKIMOFF, W. L. 1926. Le Toxoplasmosse des poissons. *Ztrbl. Bakt., I Abt., Orig.*, 101 : 217.

EXPLICAÇÃO DAS ESTAMPAS

ESTAMPA 1

Figs. 1 a 7 — Ciclo agâmico que leva à formação de esquizogametocitos (Hematoxilina de Cole e eosina Y).

Figs. 8 e 9 — Formas de divisão que levam à formação de merozoitos.

ESTAMPA 2

Fig. 1 — Dois parasitos sanguícolas, no interior de um eritrocito levemente deformado.

Fig. 2 — Forma sanguícola extraglobular (Hematoxilina de Heidenhain); observe-se o núcleo vesicular entre o terço médio e o posterior, com paranucleares em ambos os lados ($\times 1.000$).

Fig. 3 — Quisto jovem do baço, com várias células parasitadas. Observe-se que cada parasito está envolto por uma cápsula. No centro, uma forma semelhante à da fig. 2 ($\times 450$).

Fig. 4 — Secção de baço colorido por hematoxilina foscotúngstica de Mallory; na parte superior da direita, 2 quistos com pequeno número ($\times 100$).

ESTAMPA 3

Fig. 1 — Secção de fígado, apresentando, ao centro, 2 aglomerados ("nidos") parasitários com as respectivas infiltrações linfocitárias polares ($\times 100$).

Fig. 2 — Secção de rim, colorida com hematoxilina de Mallory, apresentando um grande aglomerado, parasitário. No limite inferior direito, um túbulo que sofreu colapso provocado pelo foco parasitário ($\times 100$).

Fig. 3 — Secção de baço, apresentando, ao centro e à direita, uma célula parasitada, com 4 parasitos jovens, dispostos paralelamente ($\times 1.000$).

Fig. 4 — Forma sanguícola extraglobular, colorida pelo Giemsa ($\times 1.000$).



1



2



3



4



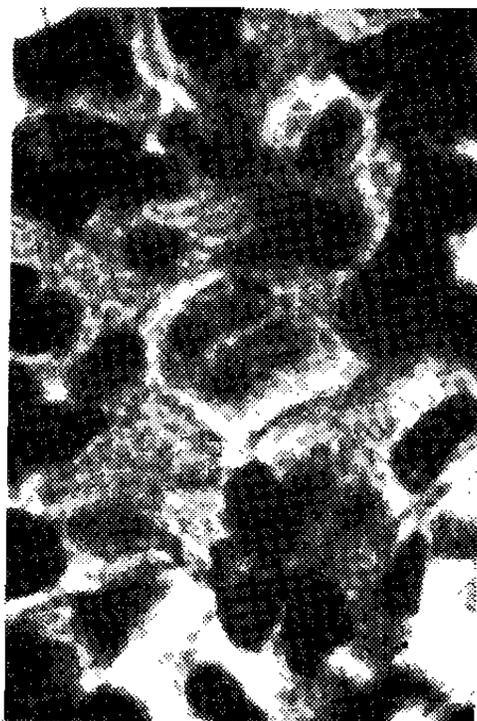
5



6



7



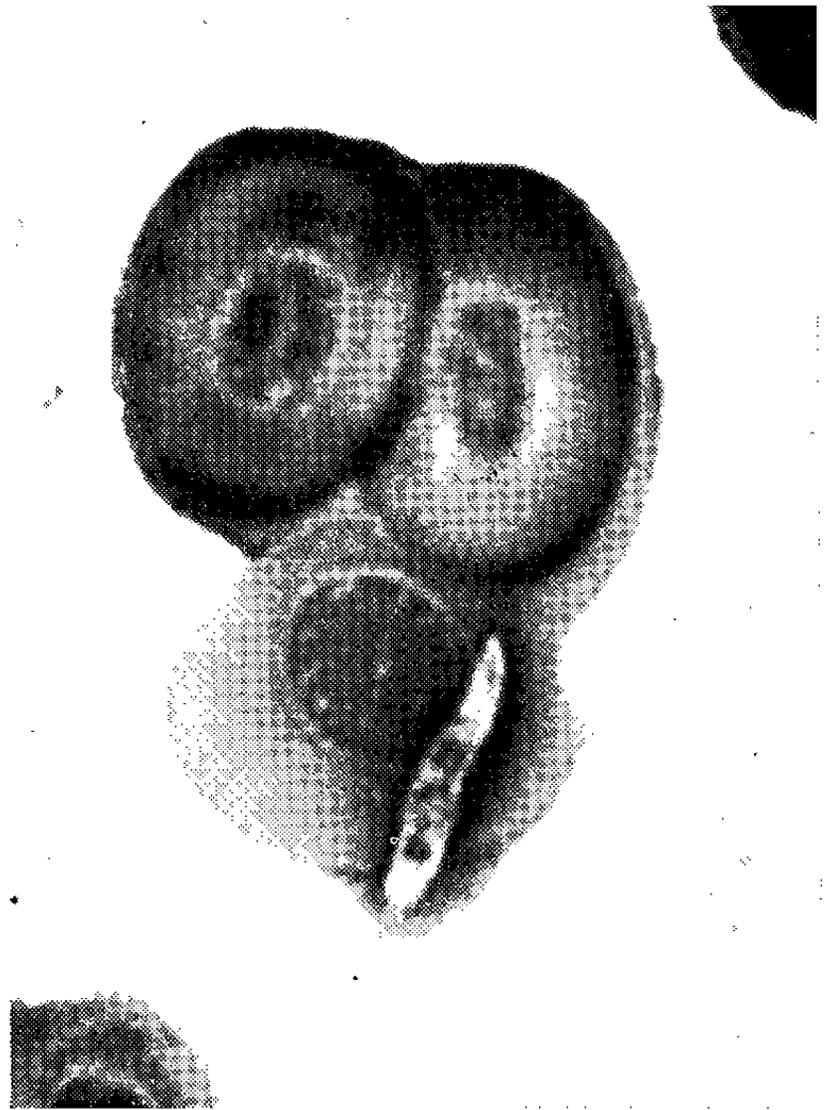
8



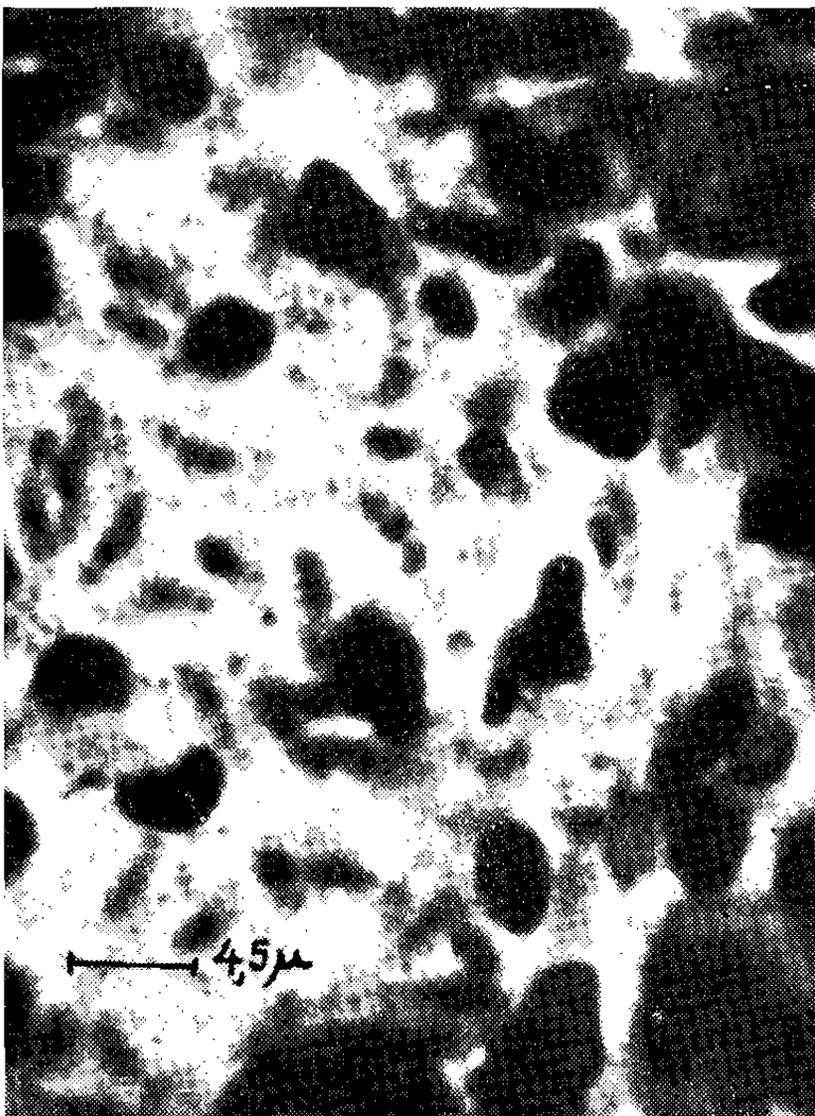
9



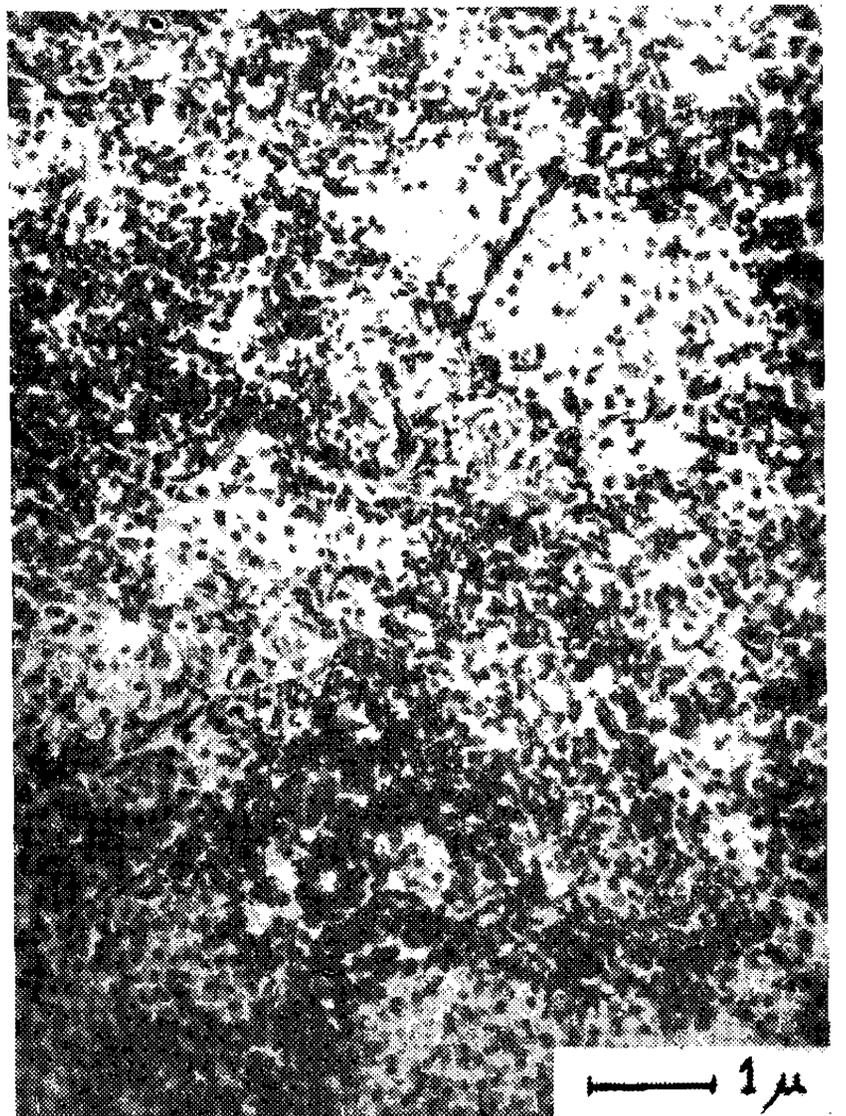
1



2



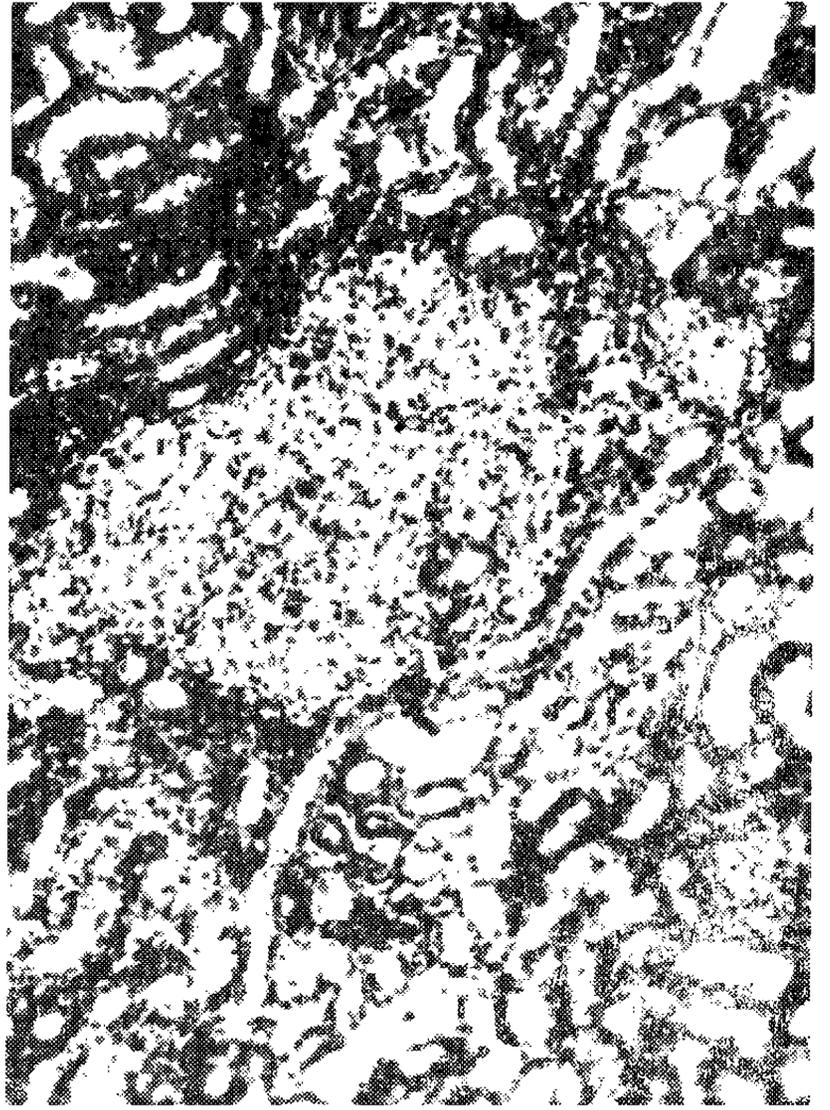
3



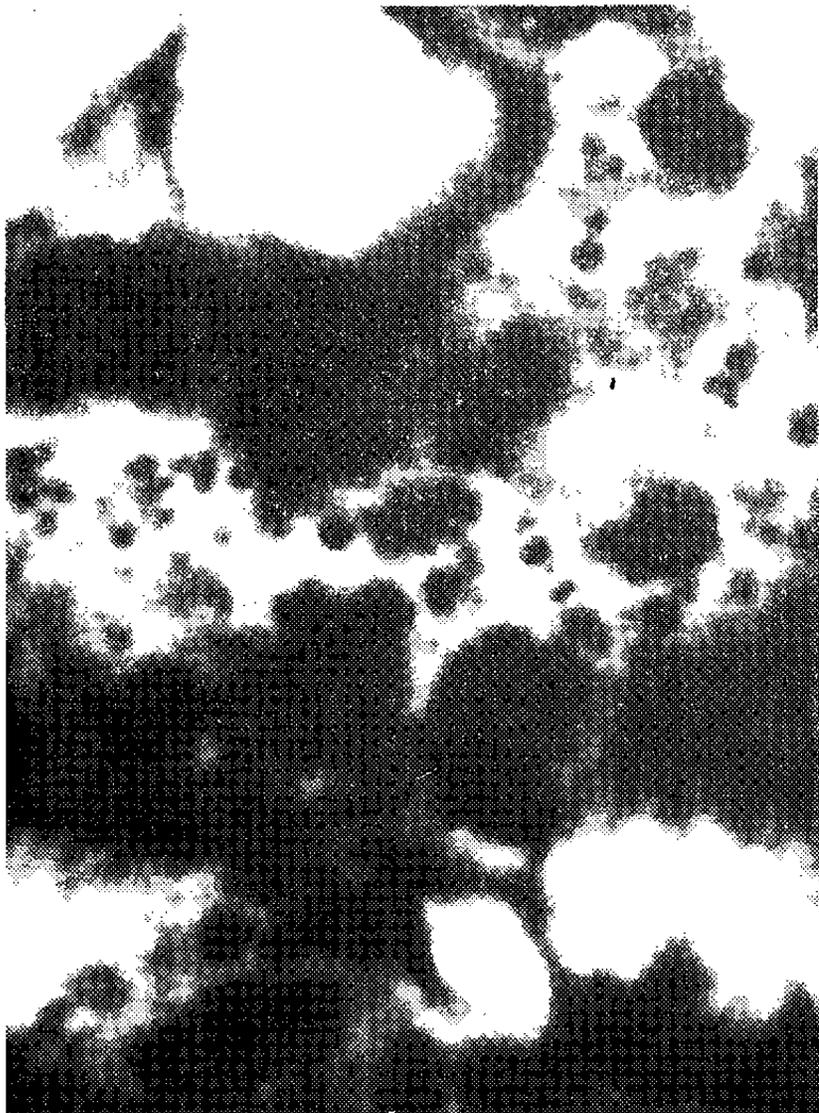
4



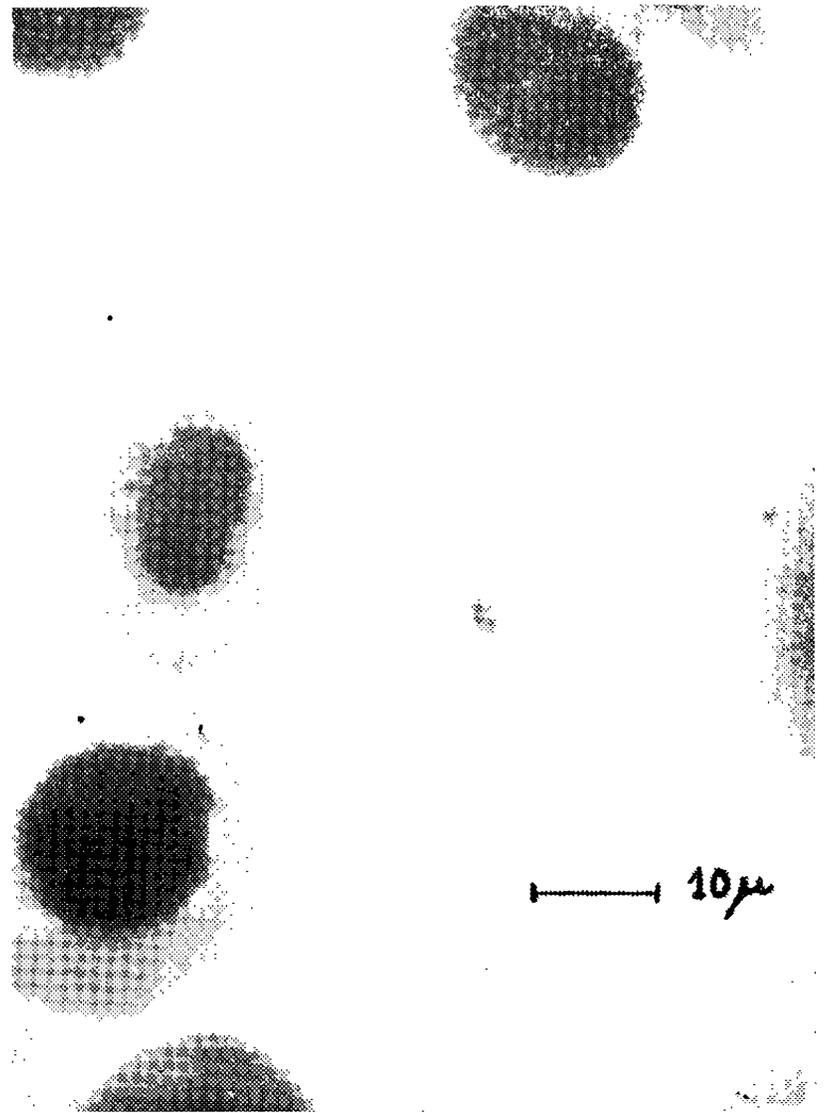
1



2



3



4