

CONSIDERAÇÕES SOBRE A NATUREZA, DESENVOLVIMENTO E
TRANSMISSÃO DE *CYTAMOEBA BACTERIFERA*
LABBÉ, 1894 DE *LEPTODACTYLUS OCELLATUS*¹

MARIA AUXILIADORA DE SOUSA* & ELIANE GUIMARÃES FREIRE*

Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil
(Com 29 figuras)

SUMÁRIO: Com o objetivo de fornecer dados para o esclarecimento do controvertido problema da natureza de *Cytamoeba bacterifera* freqüentemente encontrada nos eritrócitos de *Leptodactylus ocellatus*, realizamos alguns testes citoquímicos. Demonstramos a presença do ácido ribonucleico e polissacarídeos não digeríveis pela ptialina em sua estrutura. Com o método de Feulgen, teste de referência para a caracterização do ácido desoxirribonucleico, obtivemos principalmente resultados negativos; porém, um parasito com fraca e difusa positividade e algumas reações duvidosas também foram encontradas. Ao empregarmos o Verde Metila-Pironina, mesmo após o tratamento pela ribonuclease, e o Azul de Toluidina, também depois da ação desta enzima, não conseguimos confirmar a presença de ADN. Como os elementos constituintes de *C. bacterifera* são minúsculos e, às vezes, não evidenciáveis, é possível que seu teor de ADN, porventura existente, seja muito pequeno e, conseqüentemente, de difícil demonstração por métodos cujos resultados são observados sob microscopia ótica, além de poder ficar facilmente encoberto por outras substâncias. Não estamos propensos a admitir uma provável natureza virótica para *Cytamoeba* baseados, principalmente, em alguns de seus aspectos estruturais (figs. 8, 15, 17 e 18) e na ausência de alteração no núcleo das células parasitadas. Apesar de não termos comprovado a presença de ADN, achamos possível que *C. bacterifera* seja um aglomerado intracitoplasmático de organismos modificados, cujas dimensões situam-se nas proximidades do limite de resolução do microscópio ótico, relacionados com as bactérias, assim como são, por exemplo, os Clamídios e as Riquetsias.

Observamos o desenvolvimento de *Cytamoeba* em rã mantida em cativeiro por três meses e semanalmente examinada; constatamos decréscimo paulatino da parasitemia inicial e também que os seus tipos estruturais e medidas não estavam relacionadas com a etapa da infecção. Não conseguimos transmitir, por inoculação intraperitoneal, *Cytamoeba* de *L. ocellatus* para *Bufo crucifer*.

SEGUNDO GABRITCHEWSKY (1890)⁽¹³⁾, foi METCHNIKOFF quem pela primeira vez encontrou curiosas formações de aspecto bacteriano englobadas nos eritrócitos de uma rã infectada com *Drepanidium ranarum*. Neste seu trabalho, GABRITCHEWSKY refere-se a estes

mesmos corpos em *Rana esculenta* e, apesar de não poder definir sua natureza, supôs que fossem amebas ou larvas amebiformes invadidas por "micróbio bacteriano". Em 1894, LABBÉ⁽¹⁸⁾ criou o gênero *Cytamoeba* para, segundo ele, o hematozoário de forma ame-

¹ Recebido para publicação em 16 de julho de 1974.

* Laboratório de Protozoologia, Departamento de Zoologia, Instituto Oswaldo Cruz, C.P. 926, 20000 – Rio de Janeiro, Brasil.

bóide, desprovido de núcleo, apresentando com frequência bactérias comensais em seu interior; criou a espécie *C. bacterifera* para o que descreveu em *R. esculenta*. Por outro lado, idênticas formações foram por LAVERAN (19) denominadas *Bacillus krusei* pois, da mesma maneira que KRUSE (16), acreditou que fossem bactérias contidas em vacúolos. Assim sendo, interpretações e nomes diferentes foram dados a estruturas correspondentes. *Cytamoeba* tem sido encontrada apenas em Anfíbios, principalmente Anuros (5, 6, 9, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 28) e mais raramente Urodelos (20, 21, 30). Seu caráter infeccioso só foi testado por GABRITCHEWSKY (13) por meio de inoculações experimentais; neste nosso trabalho tentamos comprovar a infecciosidade de *Cytamoeba* inoculando *Bufo crucifer* com amostra proveniente de *L. ocellatus*; a escolha deste sapo para tal experimento foi devida à dificuldade que tivemos para encontrar rã *L. ocellatus* realmente negativa quando examinada por longo período.

Contudo, o principal objetivo deste trabalho é fornecer elementos que possam contribuir para o esclarecimento do problema da verdadeira natureza de *Cytamoeba*; assim sendo, por métodos citoquímicos procuramos demonstrar a presença de ADN, ARN e polissacarídeos em sua estrutura. Alguns de nossos resultados opõem-se aos de LEHMANN (21, 22), fato este que acentua tão controverso problema. Também levantamos dados sobre o desenvolvimento de *C. bacterifera*.

MATERIAL E MÉTODOS

Para obtermos dados sobre a evolução de *C. bacterifera*, mantivemos em cativeiro por três meses uma rã *L. ocellatus* naturalmente infectada; a escolha do exemplar foi determinada pela parasitemia de 6,8% de suas hemácias, índice este acima do normalmente encontrado em outras rãs da mesma espécie. Esfregaços de seu sangue periférico foram feitos semanalmente e após fixados a seco e corados com May Grünwald-Giemsa; observamos este material com objetiva de imersão (oc. 10 X; obj. 100 X) em microscópio Olympus HLS-II e usamos micrômetro ocular Olympus para as medidas. Computamos também os dados relativos ao percentual de hemácias parasitadas e de tipos de estrutura interna apresentados por *Cyta-*

moeba. Outras rãs desta mesma espécie, porém com menor índice inicial de parasitemia, também foram observadas.

Com esfregaços de sangue fixados por 5 minutos em álcool etílico-éter etílico (1:1) realizamos as reações de Feulgen (10), Verde Metila-Pironina (24) e Fluorescência pelo "Acridine Orange" (2) para demonstração de ácidos nucleicos. Estas mesmas técnicas foram paralelamente empregadas em material submetido à ação da solução de ribonuclease cristalizada a 0,01% em água destilada (23) a 37°C por 1 hora (4); também foram feitas como controle as colorações de Giemsa e Azul de Toluidina (4) em esfregaços submetidos ou não à ação desta mesma enzima. Para caracterização de polissacarídeos realizamos com material fixado em formalina a 10% e Carnoy, respectivamente, a reação PAS ("Periodic Acid-Schiff") (7) e a Metacromasia pelo Azul de Toluidina (24); a solução de Azul de Toluidina foi preparada a 0,01% em tampão fosfato (0,05 M) – ácido cítrico (0,025 M) de pH 4.0. A reação PAS também foi feita com material submetido à ptialina a 37°C por 30 minutos (24).

Para fluorescência utilizamos microscópio Olympus HLS-II e seu dispositivo com lâmpada de vapor de mercúrio em alta pressão; utilizamos os filtros BG 12 e BG 3 para obtenção de raios ultravioleta e a lente L-42 para condensação dos mesmos. Usamos filtros FY 3 nas oculares e entre o microscópio e a câmara fotográfica modelo PM-7; fotografamos a cores as imagens obtidas com objetiva de imersão.

O método de Gram (3) foi realizado em esfregaços de sangue fixados pelo calor.

As demais microfotografias apresentadas neste trabalho foram tiradas com uma câmara automática Orthomat montada em microscópio Orthoplan, Leitz, adaptado à iluminação de xenônio. Utilizamos filmes Panatomic-X (ASA 32; DIN 16) e Ektachrome-X (ASA 64; DIN 19) de 24 X 36 mm da Kodak para as microfotografias em preto e branco e coloridas, respectivamente.

Em virtude da dificuldade que tivemos em encontrar rãs efetivamente negativas para *Cytamoeba*, especialmente quando as mesmas eram examinadas por longo período, utilizamos sapos em nossas transmissões experimentais. Inoculamos 0,25 ml do sangue (diluído em salina) da rã mais intensamente parasitada (6,8% das hemácias) por via intraperitoneal em 2 exemplares de *Bufo crucifer*; durante 20 dias e em intervalos de 3 dias o sangue destes sapos foi examinado.

RESULTADOS

Curiosamente, durante os três meses de observação a parasitemia por *Cytamoeba* decresceu paulatinamente, conforme demonstramos na Tabela I. Decréscimo semelhante foi comprovado em outras rãs cujo sangue foi também periodicamente examinado.

Tabela I

Desenvolvimento de *C. bacterifera*: Parasitemia e Medidas

Semana	Percentual de eritrócitos parasitados	Medidas (μ) de <i>Cytamoeba</i>	
		média	limites
1. ^a	6,8	3,0 / 2,3	1,4 / 0,8 – 4,9 / 4,6
2. ^a	5,9	2,9 / 2,5	1,6 / 1,4 – 3,7 / 3,7
3. ^a	2,1	3,7 / 3,0	2,7 / 2,0 – 4,4 / 4,1
4. ^a	1,01	3,1 / 2,8	2,0 / 2,0 – 3,5 / 3,5
5. ^a	0,63	2,8 / 2,2	1,5 / 1,2 – 3,6 / 3,2
6. ^a	0,58	2,7 / 2,5	1,8 / 1,7 – 3,6 / 3,4
7. ^a	0,58	1,9 / 1,9	1,7 / 1,5 – 3,1 / 3,0
8. ^a	0,53	2,7 / 2,6	1,4 / 1,4 – 4,4 / 3,5
9. ^a	0,35	2,4 / 1,5	1,7 / 0,8 – 2,5 / 1,4
10. ^a	0,33	2,1 / 1,7	1,6 / 1,5 – 2,6 / 2,6
11. ^a	0,31	2,7 / 2,2	1,6 / 1,6 – 3,5 / 2,5
12. ^a	0,24	2,8 / 2,6	2,1 / 2,1 – 3,6 / 2,8
13. ^a	0,14	2,8 / 2,3	2,1 / 1,5 – 3,5 / 3,5
14. ^a	0,13	3,3 / 2,9	2,2 / 1,7 – 5,6 / 5,0

Cytamoeba só foi vista em eritrócitos (sempre apenas uma por hemácia), os quais não mostravam qualquer alteração pela sua presença, e nunca em outro tipo de célula ou livre no plasma. As medidas apresentadas por ela em cada observação semanal não evidenciaram qualquer relação com o estágio da infecção; o maior tamanho médio foi encontrado na 3.^a semana, porém medidas também elevadas, inclusive a maior, foram constatadas na 14.^a semana, quando o índice de parasitemia era extremamente baixo. Na Tabela I apresen-

tamos paralelamente as medidas média, mínima e máxima encontradas.

A estrutura de *Cytamoeba* também não revelou correlação com o estágio da infecção; os tipos básicos encontrados eram geralmente distribuídos ao acaso pelos diferentes períodos. Na Tabela II apresentamos o percentual dos tipos observados semanalmente. Aqui vale acrescentar que a caracterização das diferentes estruturas internas que fizemos é arbitrária e tem por objetivo facilitar a exposição de nossas observações.

Tabela II

Percentual dos diferentes tipos de estrutura de *Cytamoeba*

Semana	Homogênea	Heterogênea		
	Compacta (*)	(1)	(2)	(3)
1. ^a	7	45	48	—
2. ^a	9	64	21	6
3. ^a	—	78	15	7
4. ^a	—	68	14	18
5. ^a	40	8	48	4
6. ^a	—	69	25	6
7. ^a	12	70	12	6
8. ^a	—	90	10	—
9. ^a	22	22	56	—
10. ^a	—	57	36	7
11. ^a	39	61	—	—
12. ^a	—	93	7	—
13. ^a	5	80	5	10
14. ^a	—	82	6	12

(1) Estrutura interna geralmente caracterizada por um aglomerado de elementos semelhantes a delgados bastões (figs. 14, 15 e 16); aqui ainda enquadram-se os tipos nos quais observam-se também grânulos e aqueles com porções mais condensadas, às vezes originando bastões mais grossos (figs. 9, 10 e 12).

(2) Tipos com a periferia total ou parcialmente condensada e a porção interna aparentemente homogênea (fig. 1) ou com delgadas formações (fig. 3) ou com porções mais condensadas que outras (figs. 2 e 7) ou vazia.

(3) Parasitos de aspecto nitidamente vacuolar em cujo interior observam-se alguns elementos (fig. 8) ou porções condensadas.

(*) Exemplo bem representado na fig. 4; este tipo parece resultar do aumento de constituintes estruturais de *Cytamoeba*.

Conforme demonstramos na Tabela II, os parasitos com estrutura heterogênea-tipo 1 predominaram sobre os demais, exceto na 1.^a, 5.^a e 9.^a semanas, onde dominaram aqueles do tipo heterogêneo-2. As diferentes estruturas descritas geralmente apresentavam-se dentro de um contorno arredondado (figs. 3, 4, 7, 11 e 13) ou ovóide (figs. 1, 2 e 8), mas variações também foram observadas (figs. 5, 9, 10, 12, 14, 15, 16 e 18). Dentre estas variações, destacamos aquelas nas quais o grupo de delgados bastões situava-se além (fig. 16) ou aquém (fig. 14) dos limites de uma forma definida e outras onde grupos de elementos finos (fig. 18) ou mais grossos (fig. 12) estavam dispersos no citoplasma do glóbulo hospedeiro.

Além destas observações, assinalamos que os diversos aspectos estruturais apresentados por *C. bacterifera* sugerem estágios de sua própria evolução. Assim sendo, as figuras 1, 5, 8, 10 e 12 parecem corresponder a etapas iniciais, enquanto as figuras 4, 11 e 15 (especialmente) a fases finais.

Bastante curiosos também foram os resultados dos testes citoquímicos em *C. bacterifera*. Com o método de Feulgen, teste de referência para a caracterização do ácido desoxirribonucleico, obtivemos principalmente resultados negativos, mesmo após a extração do ácido ribonucleico (fig. 21), pois havíamos suposto que ele pudesse estar encobrendo o ADN; contudo, um parasito com fraca e difusa positividade (fig. 20) e algumas reações duvidosas também foram encontradas. Ao empregarmos o Verde Metila-Pironina, *Cytamoeba* revelou evidente pironinofilia (fig. 22), a qual desaparecia com tratamento anterior pela ribonuclease (fig. 23), assim demonstrando ser devida à presença do ácido ribonucleico em sua estrutura; positividade para o Verde Metila não pôde ser comprovada, mesmo depois da eliminação do ARN. Corada com "Acridine Orange" e exposta à ultravioleta, *Cytamoeba* exibiu intensa fluorescência vermelho-alaranjada; por este mesmo método, porém anteriormente submetida à ação da ARNase, ela ainda manteve-se alaranjada (fig. 29); assim sendo, esta técnica não serviu para demonstrar especificamente qualquer ácido nucleico; segundo PEARSE (26), com "Acridine Orange" apresentam-se com fluorescência que vai do amarelo ao vermelho, além do ARN, certos polissacarídeos e o ADN despolimerizado.

As colorações de controle feitas sem e com tratamento anterior pela ribonuclease revelaram resultados diferentes. A ação desta enzima fez desaparecer a basofilia (fig. 25) que *Cytamoeba* normalmente apresenta quando corada com o Azul de Toluidina (fig. 24), indicando que, no caso, ela era especialmente devida ao ARN. Entretanto, com o Giemsa os parasitos conservaram-se corados (fig. 26), provando que outras substâncias, além do ácido ribonucleico, estavam presentes; aqui vale assinalar, que o Giemsa, sendo um corante neutro, tem propriedades tintoriais diferentes daquelas do Azul de

Toluidina, que é um corante básico.

Cytamoeba apresentou reação PAS positiva (fig. 27), cuja intensidade variou de acordo com a densidade de sua estrutura interna, e com distribuição correspondente aos controles corados com Giemsa ou Azul de Toluidina e à porção pironinofílica; o mesmo resultado foi obtido após a ação da ptialina, assim demonstrando não ser esta positividade especialmente devida ao glicogênio e sim a outros carboidratos complexos. Pela Metacromasia com o Azul de Toluidina *C. bacterifera* mostrou-se suavemente azulada, ao lado dos núcleos celulares de tonalidade arroxeadas (fig. 28); este resultado dá margem a ampla interpretação sem qualquer valor citoquímico.

Na Tabela III apresentamos uma síntese dos resultados dos testes citoquímicos que realizamos.

Cytamoeba revelou-se avermelhada com o método de Gram, sendo portanto Gram negativa (fig. 19), da mesma maneira que as células sanguíneas e as hemobartonelas também presentes no esfregaço.

Não conseguimos positividade em nossas inoculações experimentais e mais adiante discutimos o relativo valor deste resultado.

Em nota prévia (33) assinalamos ter obtido reações fracamente positivas para *Cytamoeba* com o PAS e a Pironina. Nos resultados ora apresentados, por termos usado fucsina básica de melhor qualidade no preparo do Reagente de Schiff, *C. bacterifera* revelou mais nítida reação com o PAS. A fraca positividade para a Pironina, que anteriormente nos referimos, decorreu do emprego da técnica de Brachet modificada por KASTNER (15), na qual não há controle do pH da solução corante; ao adotarmos o Verde Metila-Pironina segundo LISON (24), o qual considera a importância do pH neste método, evidenciamos com nitidez a pironinofilia de *Cytamoeba*.

DISCUSSÃO

Desde sua descoberta (13, 16) a real natureza de *Cytamoeba* tem suscitado muitas dúvidas. Sua curiosa estrutura, na qual não se evidencia núcleo e citoplasma, mas apenas elementos imperfeitamente definidos, juntos (figs. 9, 10, 12, 15, 16 e 18) ou contidos em vacúolos (figs. 8 e 14, por exemplo), ou somente uma massa corada (às vezes apenas periférica) heterogênea (figs. 1, 2 e 7) ou homogênea (fig. 4), não é absolutamente característica dos protozoários. A denominação *Cytamoeba bacterifera* dada por LABBÉ (18) foi conseqüência da suposição de que se tratasse de um hematozoário

Tabela III

Resultados dos testes citoquímicos de *Cytamoeba*

Reação empregada	Resultados		
	Sem qualquer tratamento enzimático	Após tratamento pela ribonuclease	Após tratamento pela ptialina
Feulgen (10) (*)	negativo	negativo	—
Verde Metila-Pironina (24)	positivo para Pironina; negativo para Verde Metila	negativo para Pironina e Verde Metila	—
Fluorescência pelo "Acridine Orange" (2)	fluorescência vermelho-alaranjada	fluorescência alaranjada	—
PAS (7)	positivo	—	positivo
Metacromasia pelo Azul de Toluidina (24)	negativa	—	—

(*) Também encontramos alguns resultados duvidosos e um parasito com fraca e difusa reação positiva (fig. 20).

amebóide possuindo bactérias em seu interior (13, 17, 18). Outros autores (16, 19), discordando da existência de qualquer ameba, acreditaram que tais formações intra-eritrocitárias resultassem do agrupamento de bacilos dentro de um vacúolo, sendo esta interpretação a responsável pela denominação de *Bacillus krusei* sugerida por LAVERAN (19). As descrições e ilustrações para estruturas denominadas *C. bacterifera* ou *B. krusei* não deixam dúvidas de que as mesmas são idênticas; contudo, CARINI (6) interpretou-as como distintas e, por outro lado, HEGNER (14) considerou *C. bacterifera* como sendo um estágio na vida de um protozoário possuindo os chamados *B. krusei* em seu interior. Pelo que sabemos, até hoje não foi estabelecida a real posição taxonômica da usualmente chamada *C. bacterifera*. A definição de sua natureza faz-se necessária especialmente pelo

fato de que rãs *L. ocellatus* são amplamente empregadas nas escolas e universidades como modelos parasitológicos, sendo muito freqüente a ocorrência de *Cytamoeba* em seu sangue. Os resultados que obtivemos em nossos testes citoquímicos infelizmente não esclarecem esta problemática, a qual só se definirá após um estudo da ultra-estrutura destas formações intra-eritrocitárias; entretanto, constituem dados que se somam aos poucos existentes sobre o assunto e que reforçam o nosso ponto de vista decorrente da observação de suas características estruturais, de sua falta de afinidade, também citoquimicamente, com os protozoários.

LEHMANN (21) procurou demonstrar a presença de ácidos nucleicos e enzimas em *C. bacterifera* de salamandras; pela reação de Feulgen diz ter encontrado o ADN constituindo um anel periférico, placas densas estendendo-se sobre o

bordo ou ainda pequenos grânulos centrais; o ARN estava presente em pequena quantidade e restrito à periferia do parasito; zimogenase e fosfatase ácida também foram constatadas. Por estes fatos, LEHMANN concluiu que *Cytamoeba* é um ser vivo; apesar de mencionar que sua estrutura não apresenta evidências de suas afinidades, baseando-se no tipo de divisão observado⁽²⁰⁾, achou razoável considerá-la de natureza animal, classificando-a entre os Piroplasmídeos (*Sporozoa*).

Conforme demonstram os nossos resultados, na estrutura de *Cytamoeba* não conseguimos realmente confirmar a presença do ácido desoxirribonucleico, contrariando assim os dados de LEHMANN^(21, 22). Pensamos, contudo, que este fato não constitui indicação definitiva da ausência desta substância. Como os elementos constituintes de *C. bacterifera* são minúsculos e, às vezes, não evidenciáveis, é possível que seu teor de ADN, porventura existente, seja muito pequeno e, conseqüentemente, de difícil demonstração por métodos cujos resultados são observados sob microscopia ótica, e que possa também ficar facilmente encoberto por outras substâncias componentes do parasito, além do ARN. Aqui vale acrescentar que na literatura há referências^(8, 31) à reações nucleares negativas por ocasião do emprego do Feulgen e Verde Metila-Pironina. Por outro lado, comprovamos a ocorrência do ácido ribonucleico apresentando distribuição variada, correspondente a das formas coradas com o May Grünwald-Giemsa, Giemsa e Azul de Toluidina, e não somente periférica como encontrou LEHMANN⁽²¹⁾.

A discordância entre os resultados obtidos por LEHMANN^(21, 22) e por nós na demonstração dos ácidos nucleicos pode ser uma indicação de que os parasitos de salamandras⁽²¹⁾ e sapos⁽²²⁾ estudados por ele não sejam os mesmos aos quais nos referimos e que correspondem, sem dúvida alguma, à chamada *C. bacterifera*, conforme comprovam as nossas microfotografias. Além disto, este mesmo autor, em trabalho anterior⁽²⁰⁾, já havia chamado atenção para o fato de que os parasitos que descrevia nas salamandras e numa espécie de rã (*Rana boylei*) não se pareciam precisamente com a *C. bacterifera* referida por outros pesquisadores;

neste seu trabalho, as descrições e ilustrações são concordantes com a sua observação; por este motivo, consideramos imprópria a sua adoção para os parasitos que descreveu da denominação *C. bacterifera*.

Em certos aspectos (por exemplo, figs. 4 e 13), *Cytamoeba* assemelha-se aos "corpúsculos de inclusão" de natureza virótica; a não comprovação de ambos ácidos nucleicos em sua estrutura poderia nos inclinar a tal suposição; contudo, a total ausência de alteração nas células parasitadas e o fato de termos, em alguns casos, visualizado quase nitidamente com aumento de 1 000 X os seus elementos constituintes (bons exemplos são dados pelas figs. 8, 15, 17, 18), os quais muito se assemelhavam a delgadas e minúsculas bactérias, são fatos que nos afastam desta hipótese.

Apesar de não termos comprovado a presença de ADN em *C. bacterifera*, achamos possível que ela seja um aglomerado de organismos modificados, cujas dimensões situam-se nas proximidades do limite de resolução do microscópio ótico, relacionados com as bactérias, assim como são, por exemplo, os Clamídeos e as Riquétsias; além do mais, do mesmo modo que estes, *Cytamoeba* é Gram negativa e tipicamente intracelular. A presença de polisacarídeos demonstrada pela reação PAS (fig. 27) pode ser indicativa da presença de parede celular em seus elementos constituintes. Não acreditamos que *C. bacterifera* seja um conjunto de bactérias típicas e nem que estas estejam no interior de qualquer hematozoário, conforme supuseram alguns autores^(13, 17, 18); inclusive, em certos casos, é muito característica sua aparência vacuolar (bom exemplo dado pela fig. 8) com minúsculos organismos em seu interior.

Como mencionamos anteriormente, é alta a freqüência de *Cytamoeba* em *Leptodactylus ocellatus*; todavia, em geral é muito baixa a percentagem de eritrócitos por ela infectados (ou seja, a parasitemia). Nossas observações sempre revelaram um decréscimo da parasitemia inicial até quase seu total desaparecimento, sugerindo o alcance de um estágio de cronicidade; contrariamente, HEGNER⁽¹⁴⁾ estudando por três

meses o desenvolvimento de *C. bacterifera* em *Rana clamitans* e *R. catesbiana* não considerou haver qualquer variação acentuada no percentual de glóbulos parasitados. Este mesmo autor, assim como nós, constatou que muitos estágios evolutivos podiam ocorrer na mesma ocasião e que, com o passar do tempo, não havia grande diferença com respeito ao tamanho de *Cytamoeba*. Nossas observações também não comprovaram correlação entre os tipos estruturais encontrados e o estágio da infecção.

Alguns autores^(9, 14) admitiram uma evolução intra-eritrocitária de *Cytamoeba* e na realidade muitos de seus aspectos sugerem esta ocorrência. A comparação de seus diferentes tipos nos fazem supor que seu desenvolvimento se dê por multiplicação de seus elementos constituintes dentro da própria hemácia, a qual inicialmente seria invadida por um indivíduo (LAVERAN⁽¹⁹⁾, supôs que a princípio apenas um "bacilo" se introduziria no glóbulo). Entretanto, no presente momento, pela falta de estudos de sua ultra-estrutura ainda não é possível definir a seqüência de sua evolução intraglobular.

A alta freqüência com que *C. bacterifera* ocorre em *L. ocellatus* sugere que ela seja transmitida por meios extremamente simples, talvez até, independentes da participação de vetores (a grande maioria das rãs examinadas não apresentava ectoparasitos). Aqui vale acrescentar, que mecanismos simples de transmissão e infecções crônicas poderiam justificar a ocorrência do grande número de rãs infectadas, porém com baixa parasitemia; por outro lado, *Cytamoeba* não nos parece patogênica para a rã em questão.

Somente GABRITCHEWSKY⁽¹³⁾, pelo que sabemos, tentou transmitir *Cytamoeba* por meio de inoculações experimentais, obtendo resultados que consideramos duvidosos. Não conseguimos positividade em nossas transmissões; contudo, assinalamos que este fato não indica que *Cytamoeba* não tenha caráter infeccioso, podendo ser admitida a possibilidade de que a mesma não é capaz de contaminar a espécie de sapo usada no experimento ou que o tempo de observação foi insuficiente para seu aparecimento. Novas tentativas neste campo devem ser realizadas.

Em obras clássicas de Protozoologia^(29, 35) *C. bacterifera* está colocada, juntamente com *Toddia* e *Pirhemocytion* e outros, entre os *Incerta sedis*; contudo, nestes trabalhos há um certo equívoco entre *Toddia* e *Cytamoeba*. Atualmente sabemos que elas são perfeitamente distintas com respeito aos seus aspectos estruturais, efeitos sobre a célula hospedeira e ocorrência de inclusão associada; pelo presente trabalho, acrescentamos que também diferem em relação à citoquímica de ácidos nucleicos e polissacarídeos. Além do mais, considerando que *Toddia* e *Pirhemocytion* têm muitas afinidades^(27, 32) e baseados em várias observações e no excelente trabalho de STEHBENS & JOHNSTON⁽³⁴⁾ acreditamos na possível natureza virótica de ambos⁽³²⁾, mas não temos o mesmo parecer sobre *C. bacterifera*; conforme nos referimos anteriormente, estamos mais propensos a admitir que ela resulte da multiplicação de minúsculos organismos modificados relacionados com as bactérias.

SUMMARY

Considerations about the Nature, Development and Transmission of *Cytamoeba bacterifera* Labbé, 1894 from *Leptodactylus ocellatus*

In view to furnish data to elucidate the controversial problem of the nature of *Cytamoeba bacterifera*, which it is often found in erythrocytes of the frog *Leptodactylus ocellatus*, we have done some cytochemical tests. We displayed in its structure the contents of RNA and polysaccharides that do not undergo digestion by ptyalin. With the Feulgen's method we mainly obtained negative results, but one parasite showed a faintly diffused positivity and a few doubtful reactions were also observed. When we employed the Methyl Green-Pyronin, even after the ribonuclease treatment, and the Toluidin Blue, likewise subsequent to the activity of this enzyme, we did not evidence the DNA. Taking into account that the components of *C. bacterifera* are usually very small and sometimes undiscernible, it is probable that

their contents of DNA, perhaps existent, would be difficultly demonstrated under the light microscope, and also that it would be easily dissimulated by other substances. We do not believe in a viral nature of *Cytamoeba* mainly regarding some aspects of its structure (figs. 8, 15, 17 and 18) and the absence of damage on the nucleus of the infected cells. Although we did not prove the presence of DNA, we think that it is possible that *C. bacterifera* is an intracytoplasmic clump of modified organisms, which sizes are just within the nearness of the limit of visibility with optical microscopes, related with the bacteria, such as are, by exemple, the *Chlamydiae* and *Rickettsiae*.

The development of *Cytamoeba* was followed in a frog maintained in the laboratory during three months and weekly examined; we

observed progressive decrease of the parasitism. Its structural types and sizes were not related with the phasis of the infection. We did not get transmission by intraperitoneal inoculation of *C. bacterifera* from *L. ocellatus* to *Bufo crucifer*.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Dr. Sylvio Celso Gonçalves da Costa e ao Dr. Altair Antunes Zebal por nos terem proporcionado a oportunidade de discutir alguns pontos de sua especialidade. Também somos gratos à Dr.^a Ortrud Monika Barth que nos permitiu a realização da maioria das microfotografias em seu laboratório e ao Sr. José de Carvalho Filho pelo trabalho fotográfico da microscopia de fluorescência.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 – BARKA, T. & ANDERSON, P. J., 1963, *Histochemistry – Theory, Practice and Bibliography*, 660 pp., Harper & Row, New York.
- 2 – BERTALANFFY, L. von, MASIN, M. & MASIN, F., 1958, A new and rapid method for diagnosis of vaginal and cervical cancer by fluorescence microscopy. *Cancer*, 11 (5): 873-887.
- 3 – BIER, O., 1965, *Bacteriologia e Imunologia*, 12.^a edição, 983 pp., Melhoramentos, São Paulo.
- 4 – BRACHET, J., 1953, The use of basic dyes and ribonuclease for cytochemical detection of ribonucleic acid. *Q. Jl microsc. Sci.*, 94 (1): 1-10.
- 5 – BRANDT, B. B., 1936, Parasites of certain North Carolina Saliencia. *Ecol. Monogr.*, 6: 491-532 (não encontramos a publicação; cf. LEHMANN, D.L., 20).
- 6 – CARINI, A., 1910, Sur quelques parasites semblables a des bacilles rencontrés dans les hématies du *Leptodactylus ocellatus*. *Annls Inst. Pasteur*, 24: 152-156.
- 7 – CONN, H. J., DARROW, M. A. & EMMEL, V. M., 1960, *Staining Procedures*, 289 pp., Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- 8 – COSTA, S. C. G. & LAGE, H. A., 1966, Estudos citológicos e citoquímicos em *Stenophoridae* Crawley, 1903 (*Eugregarinidae*, Protozoa) – I. Microscopia ótica e citoquímica do núcleo. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 64: 181-185.
- 9 – COSTA, S. C. G., SILVA, A. M. & PEREIRA, N. M., 1968, Hemoparasitos de Anfíbios do Brasil: *Cytamoeba bacterifera* Labbé, 1894. *Atas Soc. Biol. Rio de Janeiro*, 12 (3): 157-159.
- 10 – DE TOMASI, J. A., 1936, Improving the technic of the Feulgen Stain. *Stain Technol.*, 11 (4): 137-144.
- 11 – DUTTON, J. E., TODD, J. L. & TOBEY, E. N., 1907, Concerning certain Parasitic Protozoa observed in Africa. *Ann. trop. Med. Parasit.*, 1 (3): 287-370.
- 12 – FROBISHER, M., 1968, *Fundamentals of Microbiology*, 8th edition, 629 pp., W. B. Saunders Co., Philadelphia, London, Toronto.
- 13 – GABRITCHEWSKY, 1890, Contribution a l'étude de la Parasitologie du sang. *Annls Inst. Pasteur*, 4: 440-445.
- 14 – HEGNER, R. W., 1921, *Cytamoeba bacterifera* in the red blood cells of the frog. *J. Parasit.*, 7 (4): 157-161.
- 15 – KASTNER, M. R. Q. & PIMENTA DE MELLO, R., 1961-1962, Identification of RNA and DNA in cancer circulantes cells by Bertalanffy fluorochrome method and methyl green-pyronin method. *Biochim. Biol. sper.*, 1 (3-4): 265-266.
- 16 – KRUSE, W., 1890, Uber Blutparasiten. *Virchows Arch. path. Anat. Physiol.*, 120: 541-560.
- 17 – LABBÉ, A., 1891, Contribution à l'étude des Hématozoaires. Sur les Hématozoaires de la Grenouille. *C. r. hebdom. Séanc. Acad. Sci., Paris*, 113: 479-481.
- 18 – LABBÉ, A., 1894, Parasites endoglobulaires du sang des vertébrés. *Archs Zool. exp. gén.*, 3 (2): 56-258.
- 19 – LAVERAN, M. A., 1899, Sur le bacille parasite des hématies de *Rana esculenta*. *C. r. Séanc. Soc. Biol.*, 11 (1): 355-358.
- 20 – LEHMANN, D. L., 1961, *Cytamoeba bacterifera* Labbé, 1894. I. Morphology and host incidence of the parasite in California. *J. Protozool.*, 8 (1): 29-33.
- 21 – LEHMANN, D. L., 1964, Cytological and Cytochemical Studies on *Cytamoeba bacterifera* Labbé, 1894. *Parasitology*, 54: 121-124.
- 22 – LEHMANN, D. L., 1966, Two blood parasites of Peruvian Amphibia. *J. Parasit.*, 52 (3): 613.
- 23 – LISON, L., 1960. *Histochimie et cytochimie animales. Principes et Méthodes*, 3.^e édition, vol. I, 397 pp., Gauthier-Villars, Paris.
- 24 – LISON, L., 1960, *Histochimie et cytochimie animales. Principes et Méthodes*, 3.^e édition, vol. II, pp. 398-842, Gauthier-Villars, Paris.
- 25 – PEARSE, A. G. E., 1968, *Histochemistry Theoretical and Applied*, 3rd edition, vol. I, 759 pp., J. & A. Churchill Ltd., London.
- 26 – PEARSE, A. G. E., 1972, *Histochemistry Theoretical and Applied*, 3rd edition, vol. II, pp. 760-1518, Churchill Livingstone, Edinburgh and London.
- 27 – PEREIRA, N. M., COSTA, S. C. G. & SOUSA, M. A., 1973, *Toddia* sp., "corpúsculo paranuclear" no sangue de *Leptodactylus* e *Bufo* do Brasil – Desenvolvimento e Citoquímica. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 71 (1-2): 19-31.
- 28 – PESSÔA, S. B. & CUNHA NETO, A. G., 1967, Notas sobre hemoparasitas de rãs de Goiânia. *Revta goiana Med.*, 13: 101-116.
- 29 – POISSON, R., 1953, Protistes parasites, intra ou extra-cellulaires, d'affinités incertains. *In*

- GRASSÉ, P. P., *Traité de Zoologie*, I (2), pp. 976-1005, Masson & Cie, Paris.
- 30 – RANKIN, J. S., 1937, An ecological study of parasites of some North Carolina salamanders. *Ecol. Monogr.*, 7: 169-269. (não encontramos a publicação; cf. LEHMANN, D. L., 20).
- 31 – RAY, H. N., DASGUPTA, B., SEN, H. G. & DUTTA, B. N., 1955, *Bull. Calcutta Sch. trop. Med. Hyg.*, 3: 170-171. (não encontramos a publicação; cf. COSTA, S. C. G. & LINS, D. C., 1966, Resultados obtidos com o Verde Metila-Pironina em comparação com o Verde Malaquita-Pironina em diferentes esporozoários. *Atas Soc. Biol. Rio de Janeiro*, 10 (2): 39-40).
- 32 – SOUSA, M. A., DE BIASI, P. & PESSÔA, S. B., 1973, Protistas "Incerta Sedis" de Ofídios do Brasil: *Toddia* França, 1912 e *Pirhemocytion* Chatton & Blanc, 1914 – Estudo Comparativo. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 71 (4): 443-468.
- 33 – SOUSA, M. A. & FREIRE, E. G., 1973, *Cytamoeba bacterifera* Labbé, 1894: Cytochemical Study, Transmission and Development. *J. Protozool.*, 20 (Suppl.): 530.
- 34 – STEHBENS, W. E. & JOHNSTON, M. R. L., 1966, The viral nature of *Pirhemocytion tarentolae*. *J. Ultrastruct. Res.*, 15 (5-6): 543-554.
- 35 – WENYON, C. M., 1926, *Protozoology*, II, 1563 pp., Baillièrre, Tindall and Cox, London.

ESTAMPA I

Diferentes aspectos morfológicos e estruturais apresentados por *Cytamoeba bacterifera* (ex: to fig. 6) durante o desenvolvimento da infecção. Coloração: May Grünwald-Giemsa. Aumento: 1.000 X (oc. 10 X obj. 100 X).

Figs. 1-5: 1.^a semana de observação.

Figs. 1-3: *Cytamoeba* com estrutura heterogênea-tipo 2, apresentando a periferia total (figs. 1-2) e parcialmente condensada (fig. 3), sendo a porção interna aparentemente homogênea na fig. 1 e heterogênea nas figs. 2 e 3. Fig. 4: *C. bacterifera* compacta. Fig. 5: Os dois tipos heterogêneos aqui apresentados sugerem fases iniciais do desenvolvimento intra-eritrocitário.

Figs. 6-7: 2.^a semana de observação.

Fig. 6: hemobartonela; em alguns raros aspectos (como aquele do parasito inferior da fig. 5) *Cytamoeba* parece-se com uma hemobartonela. Fig. 7: grande *C. bacterifera* possuindo estrutura heterogênea-tipo 2; observar internamente as porções mais condensadas que outras.

Fig. 8: 4.^a semana de observação.

Cytamoeba com aspecto nitidamente vacuolar, em cujo interior observam-se alguns elementos. (tipo heterogêneo-3).

Figs. 9 e 10: 6.^a e 7.^a semanas, respectivamente.

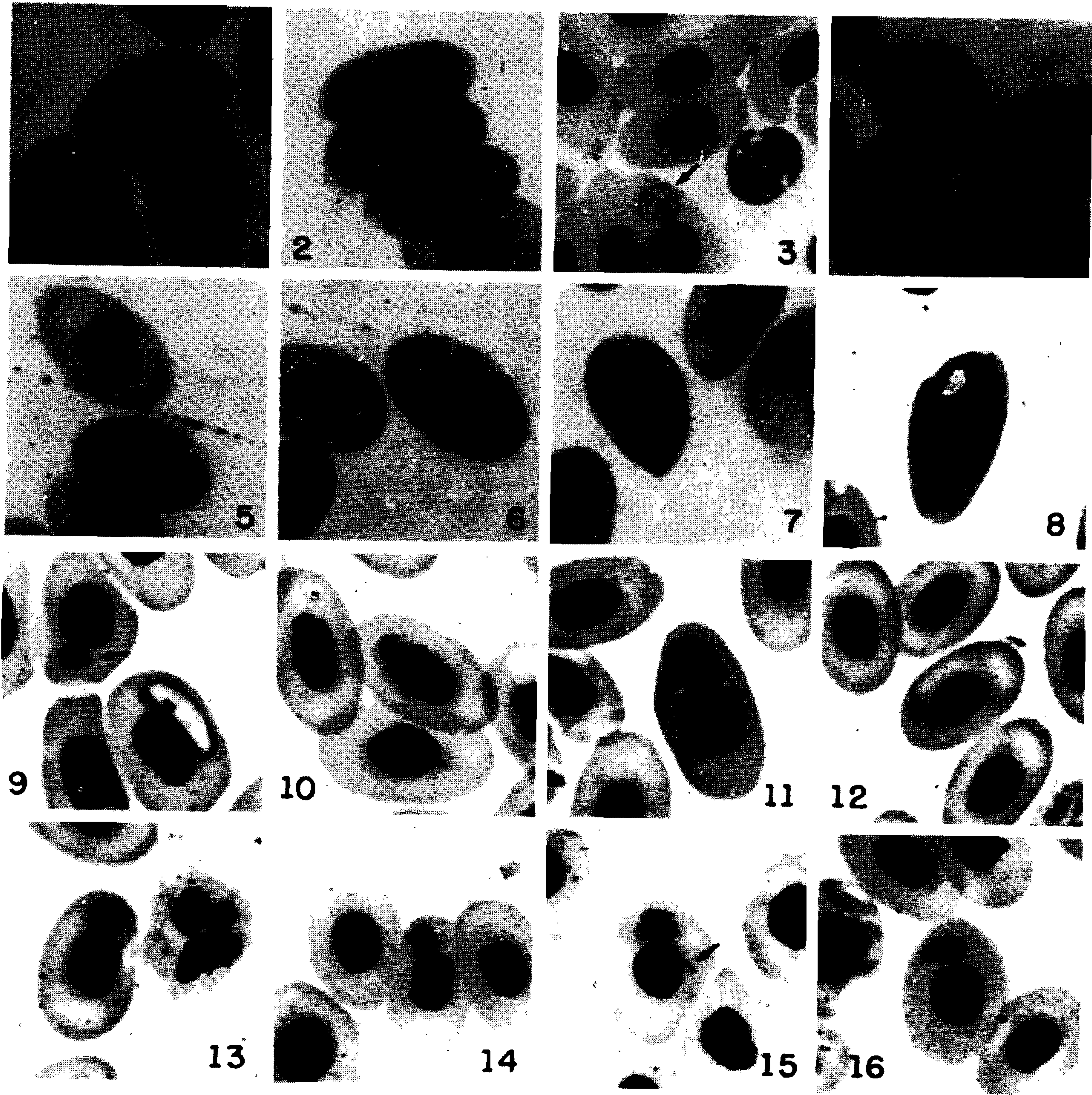
Parasitos com porções condensadas, determinando o arranjo de formações semelhantes a grossos bastões. (tipo heterogêneo-1).

Fig. 11: 12.^a semana de observação.

Grande *C. bacterifera* incompletamente preenchida.

Figs. 12-16: 14.^a semana de observação.

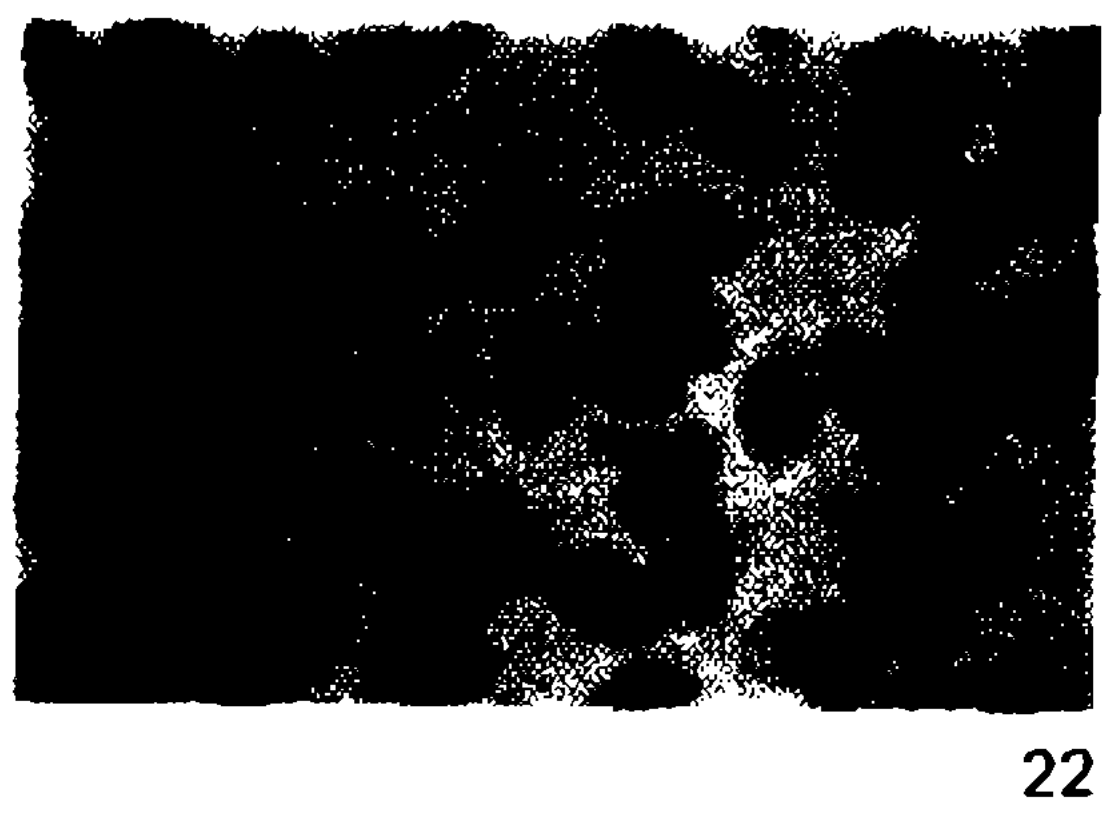
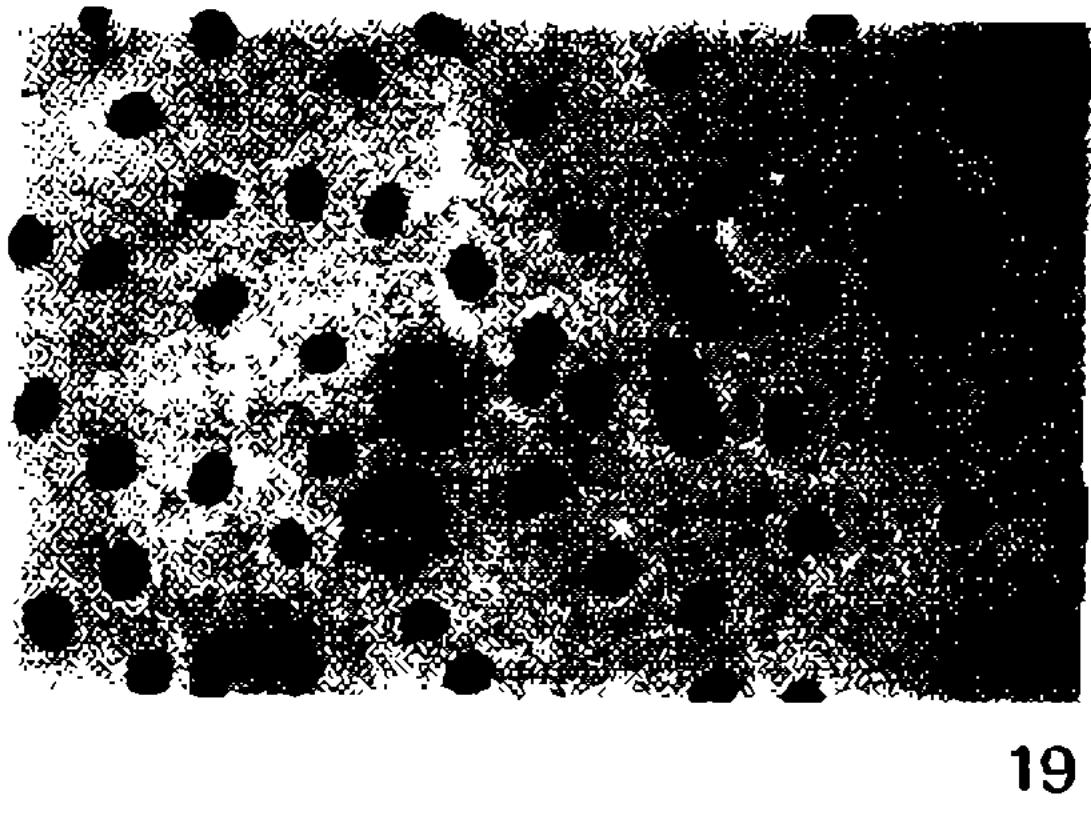
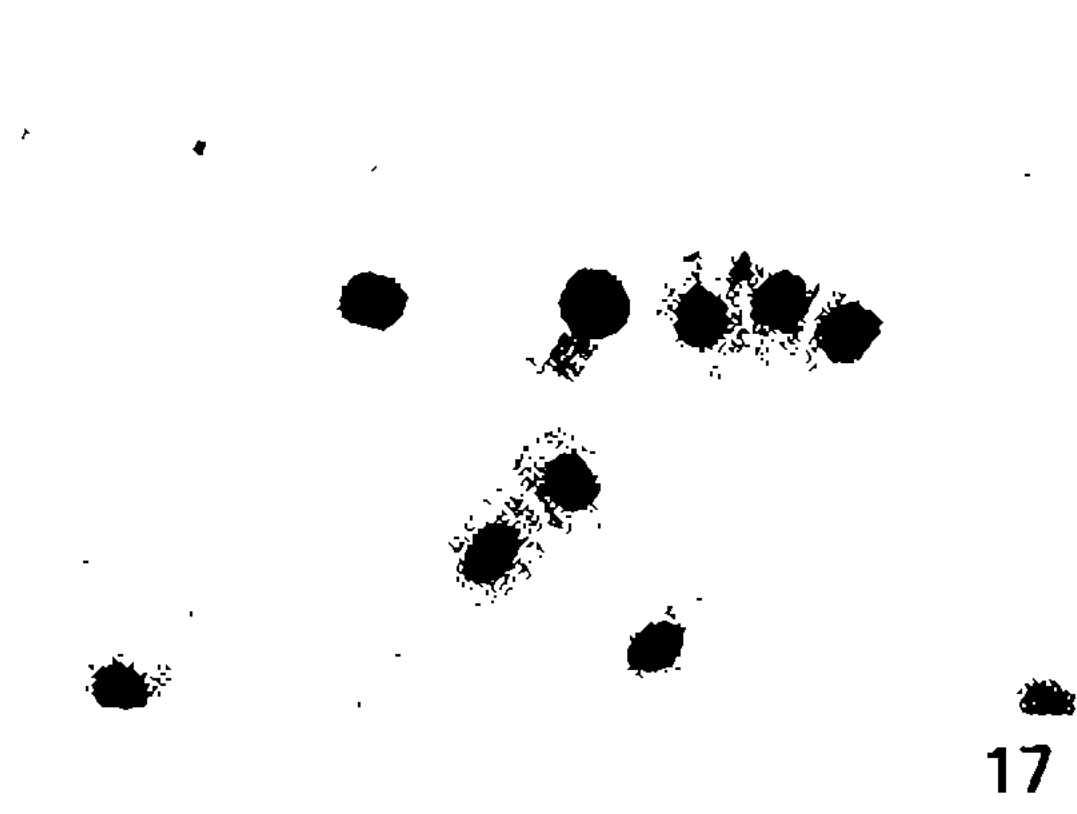
Fig. 12: Formações semelhantes a bastões mais grossos (tipo heterogêneo-1) estão próximos, mas não delimitados por um contorno definido. Fig. 13: *Cytamoeba* do tipo heterogêneo-2 com a porção interna aparentemente filamentosa. Figs. 14-16: Parasitos do tipo heterogêneo-1; nestes exemplos, especialmente o da fig. 15, é bem característico o aglomerado de elementos parecidos com delgados bastões, sendo que na fig. 14 estes preenchem incompletamente um vacúolo e na fig. 16 ultrapassam os limites de um contorno típico; ainda na fig. 15 um pequeno bastão (seta) sugere ter se desprendido do grupo.



Sousa & Freire: *Cytamoeba bacterifera*

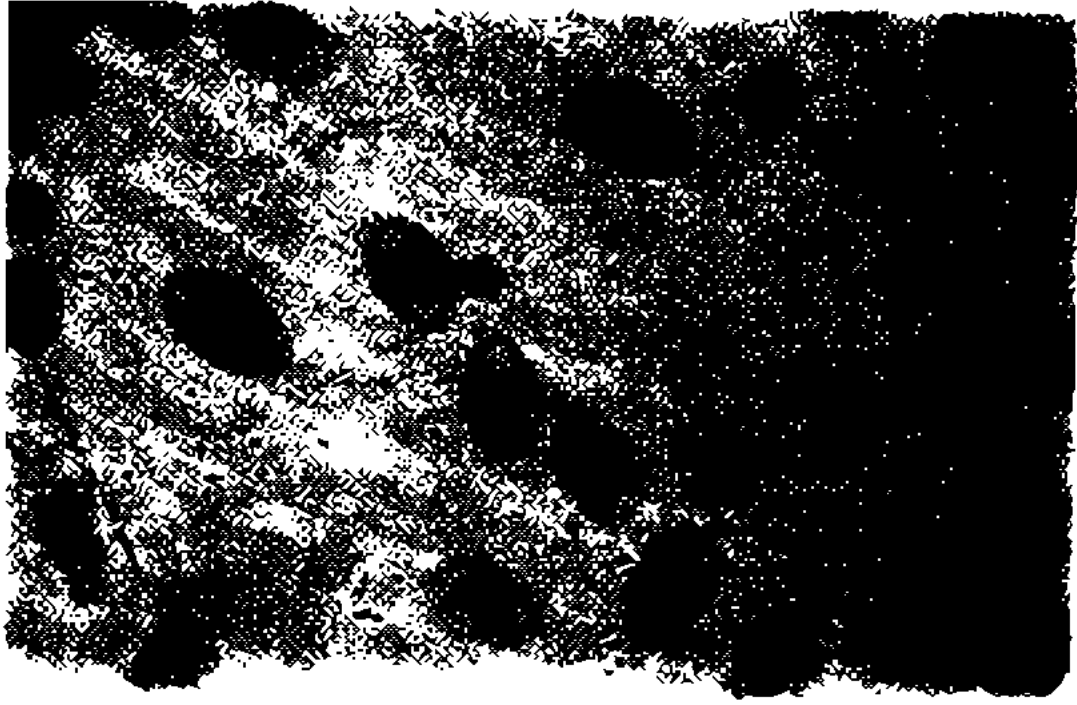
ESTAMPA II

- Fig. 17 – May Grünwald-Giemsa.
Eritrócito provavelmente rompido durante a preparação da lâmina, revelando assim os constituintes estruturais de *C. bacterifera*.
- Fig. 18 – May Grünwald-Giemsa.
Elementos delgados dispersos no citoplasma globular relacionados com *Cytamoeba*.
- Fig. 19 – Método de Gram.
Observar a Gram negatividade de *C. bacterifera*, assim como das demais células sangüíneas.
- Fig. 20 – Reação de Feulgen.
Fraca e difusa reação positiva da *Cytamoeba* situada na hemácia do centro.
- Fig. 21 – Reação de Feulgen (após a extração do ARN).
C. bacterifera apresenta-se Feulgen negativa.
- Fig. 22 – Verde Metila-Pironina.
Observar a afinidade de *Cytamoeba* pela Pironina.

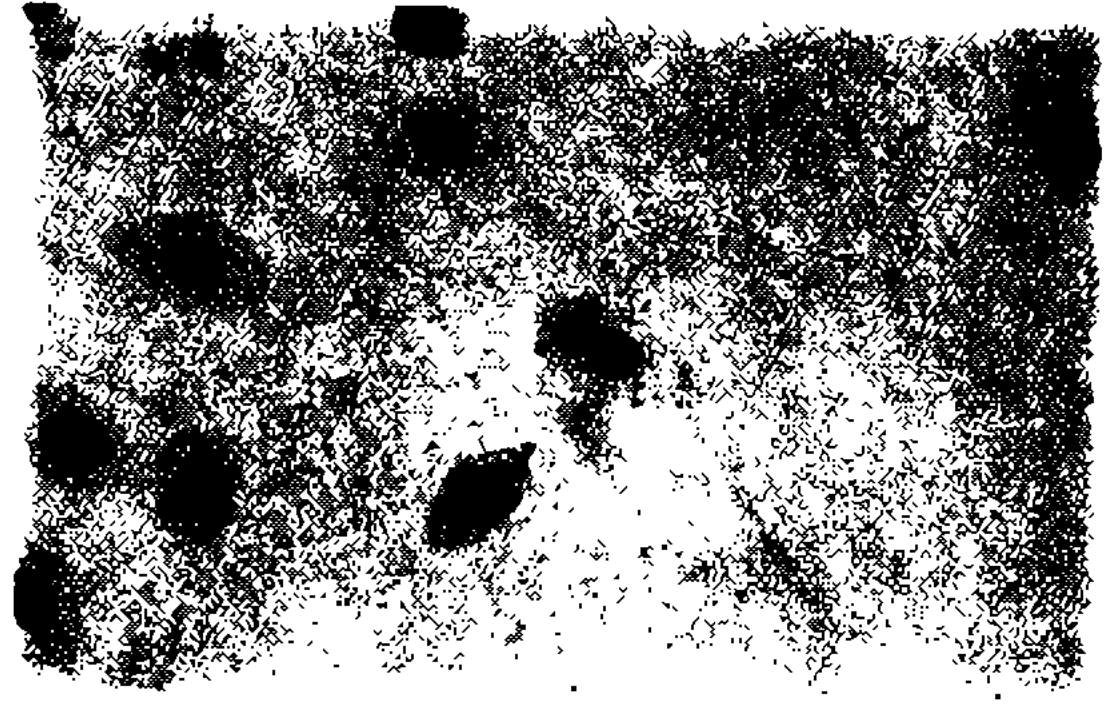


ESTAMPA III

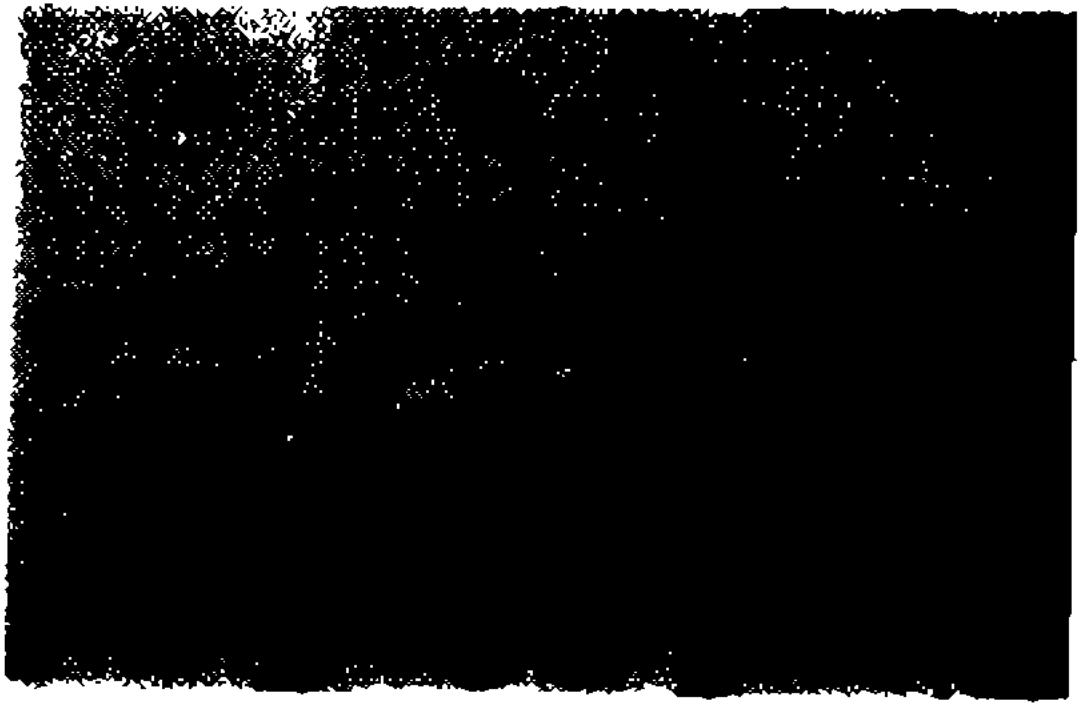
- Fig. 23 – Verde Metila-Pironina, após à ação da ribonuclease.
A pironinofilia dos parasitos desapareceu e mesmo assim não foi possível comprovar positividade para o verde metila.
- Fig. 24 – Azul de Toluidina.
Cytamoeba revela-se nitidamente corada.
- Fig. 25 – Azul de Toluidina, após o tratamento pela ARNase.
O parasito apresentou-se como uma porção clara no citoplasma do eritrócito.
- Fig. 26 – Giemsa, posteriormente à ação da ribonuclease.
Numa das hemácias vê-se uma *Cytamoeba* corada e no lado oposto dois glóbulos brancos apenas com o núcleo corado são o testemunho de que houve atividade enzimática.
- Fig. 27 – PAS.
Evidente reação PAS positiva para os parasitos situados ao lado dos núcleos celulares.
- Fig. 28 – Metacromasia pelo Azul de Toluidina.
C. bacterifera apresenta-se suavemente azulada junto aos núcleos arroxeados.
- Fig. 29 – Fluorescência com “Acridine Orange”, após à ação da ribonuclease.
Observar a fluorescência alaranjada de *Cytamoeba*.



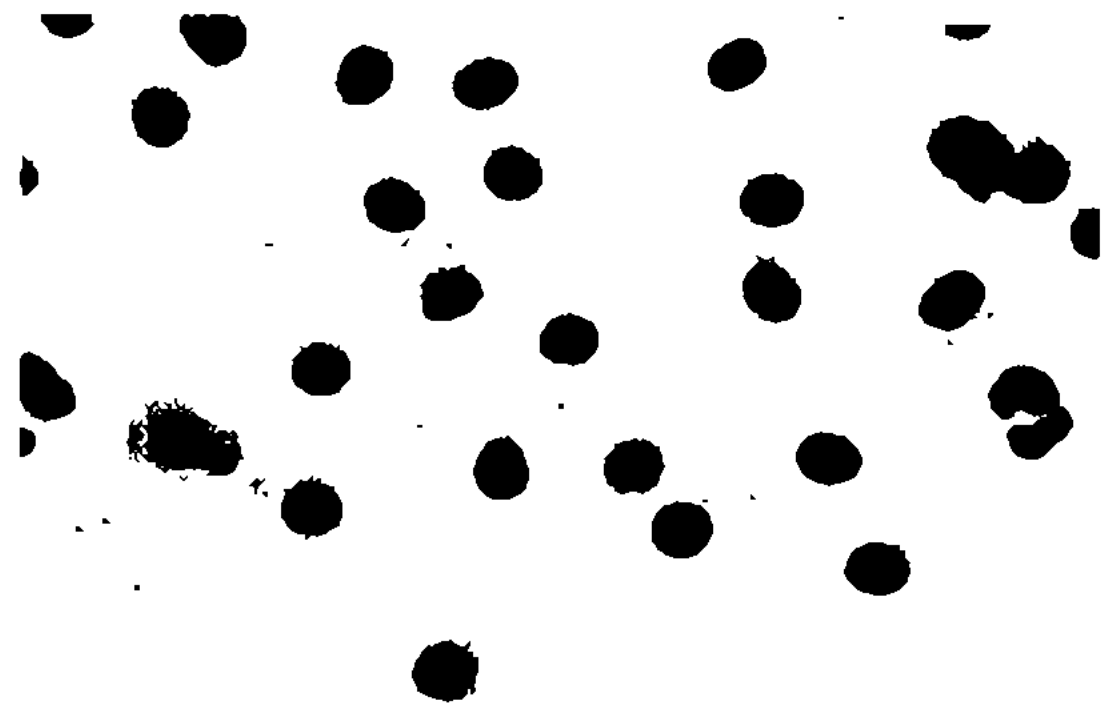
23



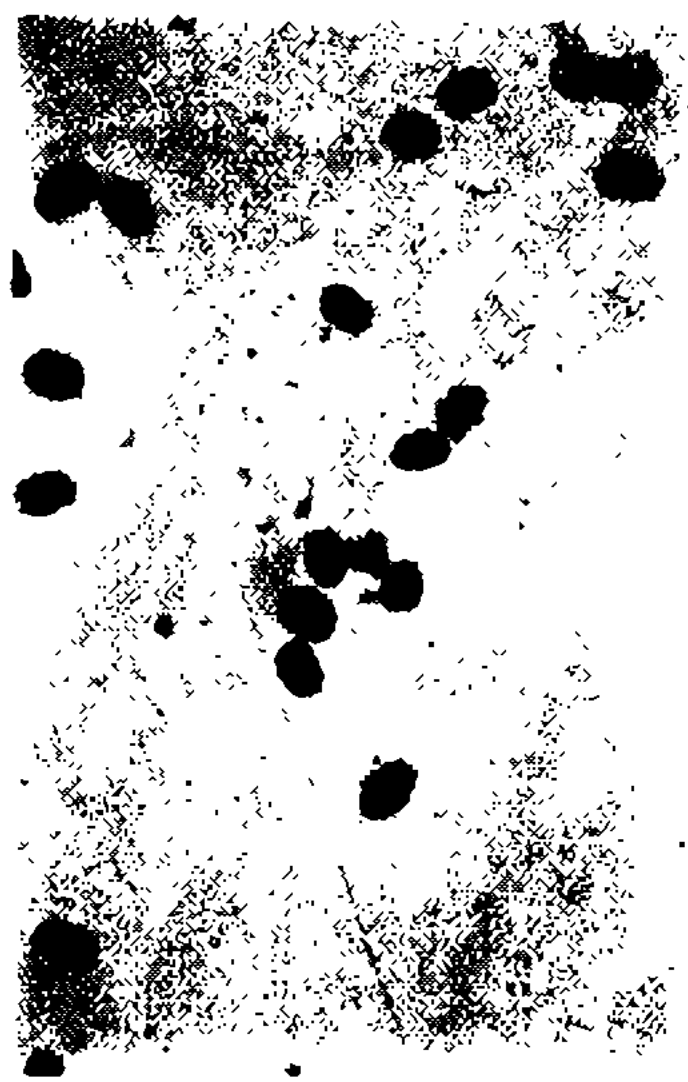
24



25



26



27



28

29