

Contribuição para o estudo dos parasitas intraglobulares dos lacértidas

Plasmodium diploglossi n. sp. *Plasmodium tropiduri* n. sp.

pelos Drs.

H. de Beaurepaire Aragão e Arthur Neiva

Assistentes do Instituto.

(Estampa 3)

A contribution to the study of the intraglobular parasites of the lizards.

Two new species of *Plasmodium*, *Pl. diploglossi* n. sp. and *Pl. tropiduri* n. sp.

by Drs.

H. de Beaurepaire Aragão e Arthur Neiva

Assistents.

(Plate 3)

Até 1901 não se conhecia, nos animais de sangue frio, outros parasitas dos globulos vermelhos além das hemogregarínias. Nessa época, Simond descreveu um hematozoario pigmentado no sangue de uma tartaruga (*Trionyx indicus*, Gray) o qual elle denominou de *Hemamaeba metchnikovi*. Mais tarde, em 1904, Castellani viu outro parazita da mesma natureza, no sangue do *Hemidactylus leschenaulti*, Gray e aproveitou a ocasião para crear com este hematozoario e o descrito por Simond, novo genero, *Hemocystidium*, a que elle dá carater provizorio, ao mesmo tempo que assinalava a grande semelhança entre esses parasitas e os hemoproteos das aves. A nós parece que os hematozoarios de Simond e Castellani deveriam ser incluídos entre os hemoproteos, até que o conhecimento mais completo do ciclo delles viesse justificar sua colocação em outro genero.

Estas considerações vêm a proposito de dous novos parasitas intraglobulares dos lacértidas, bem diferentes dos precedentes que tivemos, ha algum tempo, ocasião de observar e que, morfolojicamente, têm os caracteres dos plasmodios do tipo proteozoma das aves.

Up to 1901 the only intraglobular parasites known from cold blooded animals belonged to the haemogregarinae. At that date Simond described a pigmented haematozoon from the blood of a turtle (*Trionyx indicus* Gray) and gave it the name: *Haemamoeba metchnikoffi*. Later, in 1904, Castellani, having observed another parasite of the same kind in the blood of the *Hemidactylus leschenaulti*, Gray, established for this and the one observed by Simond a new genus: *Haemocystidium* which he considers as only provisory, noticing at the same time the great resemblance between these forms and the haemoproteus of the birds. It seems to us that both haematozoa ought to be included in the genus *haemoproteus*, at least until a more perfect knowledge of their evolution might justify the establishment of a new genus.

These reflexions were made while we had the chance of observing two other blood-parasites of lizards which morphologically fol-

Um desses parasitas foi encontrado no sangue de *Diploglossus fasciatus* D. B. obtidos no Xerém, Estado do Rio, por um de nós (Neiva), o outro observámos em preparados de sangue de *Tropidurus torquatus*, Wied., que nos foram trazidos de Bicudos, Estado de Minas, pelo Dr. Carlos Chagas.

Atenta a semelhança morfológica desses hematozoários com os plasmodios, resolvemos colocá-los nesse gênero, designando-os respectivamente, *Plasmodium diploglossi* e *Plasmodium tropiduri*, até que o conhecimento mais completo venha mostrar a necessidade da inclusão delles em outro gênero.

Plasmodium diploglossi

Este parasita é encontrado no sangue do *Diploglossus fasciatus*, vulgarmente conhecido por lagarto cobra, lacértida bastante raro e do qual, até agora, só tivemos ocasião de observar quatro exemplares, dois do Xerém, infetados, e os outros de Ouro-Fino, Estado de Minas, não parasitados.

Aqui no Instituto, tivemos vivo durante alguns dias, um dos exemplares de *Diploglossus* com grande infecção e foi com elle que conseguimos fazer as experiencias abaixo mencionadas.

Em primeiro lugar tentámos infetar outros lacértidas (*Tropidurus torquatus*, *Ameiva surinamensis*, *Mabuia agilis*, D. B., *Hemidactylus mabuia*) inoculando-lhes por via intra-muscular, sangue retirado do animal infetado. Não foi possível obter a infecção em numerosos animais inoculados.

Procurámos também fazer com que mosquitos diversos, *Culex confirmatus*, An., *Culex taeniorhynchus*, Wied., muito comuns nos lugares em que o lacértida é encontrado, o picassem; elles, porém, sempre se recusaram a isso.

Tendo morrido, inesperadamente, o animal infetado que possuíamos não nos foi possível experimentar com outros mosquitos e demais insetos sugadores de sangue e ixódidas. Nenhum ecto-parasita foi encontrado sobre os animais infetados ou não.

O estudo do parasita foi feito em preparações a fresco, entre lamina e laminula ou

low the type of the proteosoma of the birds. One of them was found in the blood of a *Diploglossus fasciatus*, D. B. caught by one of us (Neiva) in Xerém (State of Rio de Janeiro), the other was discovered in bloodsmears of a *Tropidurus torquatus*, Wied., brought by Dr. Carlos Chagas from Bicudos in the State of Minas. Considering the morphological resemblance of these cytozoa with the plasmodia we shall include them in this genus as *Plasmodium diploglossi* and *tropiduri*, while waiting for a more complete knowledge which might oblige us to place them in another genus.

Plasmodium diploglossi n. sp.

This organism was found in the blood of the *Diploglossus fasciatus*, commonly known as *snakelizard*, a rather rare kind of which up to date we have only observed four specimens, two of which were infected, while the two others (from Ouro Fino in the State of Minas) were free from blood parasites.

One of them could be kept alive during some days; it showed a very strong infection and gave us the chance to perform some experiments. In first instance we tried to infect some other lizards (*Tropidurus torquatus*, *Hemidactylus mabuia*, *Ameiva surinamensis* and *Mabuia agilis* D. B.), by inoculating them in the muscles with blood obtained from the infected animal, but in all the numerous experiments we failed to reproduce the infection.

After that we tried to have the animal bitten by two kinds of mosquitos commonly found in the same places as the lizards (*Culex confirmatus* and *C. taeniorhynchus*), but both refused to bite.

The unexpected death of the infected animal prevented us from experimenting with more mosquitos and bloodsucking insects or

em gota pendente e em preparações fixadas pelo álcool metílico e corados pelo Giemsa.

O parasita é essencialmente intraglobular; nas preparações a fresco, quando ainda muito joven, aparece sob a forma de pequena massa arredondada que não excede a 2μ , colocada no protoplasma do globulo, junto a uma das extremidades. Apresenta-se, então, constituído por pequena massa de protoplasma de estrutura finamente alveolar, de colorido amarelo palido, no interior está o nucleo que aí aparece sob a forma de pequeno corpusculo arredondado. Coradas pelo Giemsa, estas formas se apresentam com o aspeto de pequeno anel ou de pequena massa poligonal e são constituídas por porção de protoplasma corado em azul claro; no centro ou em uma das bordas existe pequena massa de cromatina intensamente corada em vermelho rubi e ás vezes ainda, pequeno vacuolo nutritivo. Est. 3, figs. 1, 2, 11 a, b, 12 e 13.

Em periodo mais adiantado do desenvolvimento, o parasita começa a tomar a forma alongada e não tarda a se curvar sobre a extremidade do nucleo do eritrócito, começando a envolvê-lo. Desde que o parasita tenha atingido certo desenvolvimento, começa-se a observar nas formas pertencentes ao ciclo esquizogónico, a divisão nuclear e o aparecimento de granulos de pigmento castanho-escuro. Est. 3, figs. 3, 4, 5 e 12 b.

A influencia do parasitismo não tarda a se fazer sentir sobre os globulos; o colorido torna-se um pouco menos intenso, o nucleo se deforma, a célula aumenta de dimensões e apresenta o contorno menos regular que normalmente; pode atinjar, então, 19μ de comprimento, por 11μ de largura, quando, normalmente, estas dimensões não excedem a $15 \times 9 \mu$.

Continuando o parasita a se desenvolver, cerca francamente o nucleo que se torna arredondado e, ás vezes, fundindo-se as extremidades, forma anel completo em torno d'elle, enquanto o globulo se apresenta cada vez mais hipertrofiado.

Já se póde, então, observar no protoplasma do parasita, tanto a fresco, como nas prepara-

ixodidae. We also failed to find ectoparasites on any of the four specimens.

The parasite was studied in fresh preparations, under coverslip and in hanging drops, as well, as in dry bloodsmears fixed in methylated alcohol and stained by Giemsa's fluid. It is essentially endoglobular being observed in fresh preparations, when still young, in the shape of small rounded bodies, not more than two mikra in diameter, inside and near to one end of the red bloodcells. They consist of a finely alveolar protoplasm of pale yellow colour enclosing a small rounded nucleus. In Giemsa's preparations they appear as small ringshaped or polygonal masses, stained pale blue, with rubycoloured particles of chromatin lying in the centre or more peripherically; sometimes a small vacuole is also found. (Plate 3, Fig. 1, 2, 11 a, b, 12, 13).

While the evolution is progressing the parasite takes a more elongated shape curling around the nucleus; at an early periode one detects in the forms belonging to the schizogonic cycle the division of the nucleus and the apparition of granules of dark brown pigment. (Plate 3, Fig. 4, 5, 12 b, c).

The influence of the parasite on the red bloodcells appears soon: the colour becomes paler, the nucleus is deformed, the cell increases and its outlines become less regular. It may attain $19:11$ mikra while the normal dimensions never exceed $15:9$ mikra. While continuing its growth the parasite includes completely the nucleus which becomes rounded; the ends of the parasite may unite so as to form a perfect ring.

In later stages the protoplasm of the parasite shows — in fresh, as well as in dry and stained preparations — a varying number of chromatin corpuscles and granules of pigment corresponding in number to the deve-

ções coradas, numero variavel de massas de cromatina e granulos de pigmento, em proporção com o desenvolvimento delle, acumulados quazi todos em um ponto do protoplasma. Est. 3, figs. 12 e, f e 13 b.

Os esquizóntes, em fase mais adiantada de desenvolvimento se apresentam sob a fórma de massa de protoplasma cheia de fragmentos de cromatina e com mais pigmentos que nas fases anteriores e ocupam todo ou quazi todo o protoplasma do eritrócito. Est. 3, figs. 7, 8, 9, 11 d e 13 c.

O numero de massas de cromatina nessas fórmas, não raro excedem a 40. Cada uma corresponde a um futuro merozoito, na ocasião da completa divizão do parazita. Est. 3, fig. 11 d. Os merozoitos, uma vez formados, se separam e vão parазitar novos eritrócitos. Em um campo de um de nossos preparados elles se encontravam livres entre os globulos. Est. 3, fig. 11 c. Nas preparações a fresco, porém, nunca lográmos observar a passagem dos merozoitos para o plasma ou para os globulos.

Os merozoitos, no interior dos globulos ou livres aparecem nas preparações fixadas e coradas com fórma quazi triangular; a fresco, porém, são arredondados e têm a cromatina excentricamente colocada.

Não conseguimos determinar o prazo da evolução esquizogonica, por apresentar sempre o animal as mais variadas fórmas no sangue.

Os gametos do *Plasmodium diplogossi* se distinguem facilmente em machos e femeos.

Sua evolução no interior do globulo não é muito diversa da de uma forma esquizogonica. Elles, aos poucos, se expandem pelo protoplasma do globulo, cercam, deformando o nucleo, assim como hipertrofiam a celula. Est. 3, figs. 5, 10, 12 f e 13 d.

Os gametos femeos apresentam um protoplasma denso em que se vêm disseminados numerosos pequenos granulos de pigmento, um pouco dezeguais, além de um ou outro vacuolo; o nucleo é representado por massa de cromatina, maior, cercada, geralmente, de numerosos granulos menores. Não raro se vêm ainda, dispersos no protoplasma do gameto 2 ou 3 pequenas massas

loppment and forming a group in one point of the protoplasm. (Plate Fig. 12 c, e, f and 3 b).

The schizontes in a more advanced stage of development appear in the form of a mass of protoplasm full of chromatin fragments and with more pigment than in the former stages occupying all or nearly all the protoplasm of the red bloodcell. (Plate 3, fig. 7, 8, 9, 11 d, and 13 c).

The number of the chromatin granules in the stages figured there may exceed forty and each one corresponds to a future merozoite. (Fig. 11 d) After the dissolution of the schizont these infect new globules. In one of our dry slides. (Plate 3, Fig. 11 c) they were found free between the bloodcells, but in fresh preparations we could never observe the passage of the merozoites in the plasma or in other globules.

The endoglobular or free merozoites appear in fixed and stained preparations in nearly triangular shape but in fresh preparations they are rounded, with the chromatine excentrically located.

We could not determine the time employed in the schizogonic evolution because the different stages were all found at the same time.

The gametocytes and macrogametes of the *Plasmodium diploglossi* are easily distinguished. Their evolution inside of the globules is not very different from that of the schizogonic form. They expand gradually in the protoplasm of the bloodcells, enclose and deform the nucleus and produce the hypertrophy of the cell itself. (Plate 3, Fig. 5, 10, 12 f. 13 d).

The female gametes show a dense protoplasm containing numerous small and somewhat unequal pigment granules and also some vacuoles. The nucleus is represented by a

de cromatina, muito provavelmente produtos emanados do nucleo.

Os gametos femeos se distinguem dos machos pelo tamanho, que é menos avantajado, pelo protoplasma pouco denso e muito menos intensamente córavel, pela fina e abundante pigmentação e pelo nucleo, que é representado por pequena massa arredondada, que constitue o centro, a partir do qual se irradiam, disseminando pelo protoplasma, pequeninas massas de cromatina que formam, em torno delle trama muito delicado.

No sangue examinado entre lamina e lamínula ou em gota pendente, observa-se que, ao cabo de algum tempo os gametos tomam a forma esferica e que o pigmento começa a apresentar movimentos que chegam a ser muito intensos, durante algum tempo no gameto macho; nunca, porém, observámos a emissão de flagelos, talvez porque as condições do meio não fossem favoraveis ao fenomeno, pois muito rapidamente cessava o movimento do gameto, indicio da diminuição de vitalidade.

Plasmodium tropiduri n. sp.

Este parazita só foi estudado até agora em preparados de sangue córados pelo Giemsa. Máo grado todos os esforços, não conseguimos, até agora, obter animais vivos, infetados para nelles estudar a evolução do parazita.

A disseminação da infeção nos tropiduros parece não ser muito vasta, pois, até agora, não encontrámos um só animal infetado, entre muitos provenientes do Rio, do Xérem, de Juiz de Fóra e S. Paulo, ao passo que em Bicudos, segundo nos afirmou o dr. Chagas, quazi todos os tropiduros estão infetados.

O *Plasmodium tropiduri* é parazita bem menor que o precedentemente descrito e, ao contrario delle apresenta a maior semelhança morfolojica com os plasmodios do tipo proteozoma do sangue das aves.

Nos globulos infetados, os parasitas são quazi exclusivamente encontrados nas extremidades da celula e nesse ponto se processa toda evolução. Não raro, nos eritrócitos em que existem dous parasitas, cada um ocupa uma das extremidades.

larger mass of chromatin surrounded generally by other smaller ones. It is not very rare to observe two or three smaller chromatin masses distributed in the cellplasm which are probably derived from the nucleus.

These microgametocytes are distinguished from the macrogametes by their smaller size, the less dense and paler protoplasm, the larger and less abundant pigment granules and by the conditions of the nucleus. It consists in a small rounded chromatin mass, forming the centre from which small chromatin particles radiate into the protoplasm in the shape of a delicate network.

In fresh preparations the gametocytes and macrogametes after some time take a spherical shape and shortly afterwards the pigment begins to show movements which in the former may become very intense. We could never observe the emission of flagella, perhaps because the conditions of the medium were not favourable, as the speedy diminution of the motility seemed to indicate.

Plasmodium tropiduri n. sp.

The *Plasmodium tropiduri* has been studied only in bloodsmears stained with Giemsa's fluid, as all our efforts to obtain living infected specimens of the host remained unsuccessful.

The parasite does not seem to be very wide spread, as we could not find an infected individual amongst a great number of specimens from Rio de Janeiro, Xerem, Juiz de Fóra and São Paulo, while in Bicudos (State of Minas) Dr. Chagas found almost every individual infected.

This plasmodium is much smaller as the one previously described and, in contrast with it, shows the greatest resemblance with the

Os globulos parasitados pelas formas mais desenvolvidas do hematozoario apresentam-se, geralmente, um pouco aumentados de volume e deformados, principalmente na extremidade em que se assesta o parazita. Tambem o nucleo não escapa á influencia do parazitismo e apresenta-se, ás vezes, ligeiramente deformado.

As formas mais jovens deste plasmodio não se diferenciam muito das do anteriormente descrito; são representadas por pequenos corpusculos arredondados ou em forma de anel, constituídos por diminuta porção de protoplasma córado em azul claro pelo Giemsa, tendo, ás vezes, vacuolo nutritivo e massa de cromatina excentricamente colocada. Est. 3, fig. 14.

Caracterizam fase mais adiantada na evolução do parazita, as fórmulas um pouco maiores que as precedentes alongadas ou, então, quazi regularmente redondas e ainda sem indícios de segmentação nuclear. Est. 3, fig. 15.

As formas pertencentes ao ciclo esquizogonico, desde que um pouco mais desenvolvidas começam a apresentar o nucleo fragmentado, observando-se nellas pequenos granulos de pigmento.

Nenhum indicio de divizão mitozica se observa nos esquizóntes, nos quais o maximo de merozoitos pode atinjar a 12. São mais ou menos regularmente arredondados, e apresentam-se constituídos por massa de protoplasma de contornos irregulares, tendo no interior pequenas massas de cromatina, em numero variavel, proporcional ao seu desenvolvimento, até o maximo acima assinalado; o pigmento aparece nellas aglomerado em um ponto. O diametro das maiores formas mais desenvolvidas não excede a 7 a 8 μ . Est. 3, figs. 16, 17, 18 e 19.

Quando o numero de merozoitos atinje ao maximo, acima citado, começa a segmentação do protoplasma, em torno de cada um e assim, constituem-se os merozoitos destinados a infeção de novos globulos.

Os gametos do *Plasmodium tropiduri* se distinguem perfeitamente, nos preparados córados, pelos seus caracteres proprios em masculinos e femininos. Tanto uns, como outros

proteosoma of birds. In the infected globules the parasites are almost invariably found at the end of the bloodcells where the whole evolution is performed. It is not rare to find in the same globule two parasites, each of which occupies the opposite end of it.

The erythrocytes containing the larger forms are generally swollen and deformed, principally at the end where the parasite is located. The nucleus also sometimes shows the influence of the parasite by a slight deformation.

The younger stages of the plasmodium do not differ much from the forms described before, being small rounded or ringshaped bodies of protoplasm staining pale blue by Giemsa's method and showing sometimes a nutritive vacuole and an excentrically located chromatine mass. (Plate 3, Fig. 14).

A more advanced stage of the parasite is known by somewhat larger forms, either elongated or almost regularly rounded but not showing yet any indication of segmentation of the nucleus. (Plate 3, Fig. Fig. 15). Still later forms show fragmentation of the nucleus and small granules of pigment. There is no indication of mitosis in the schizogonic forms in which the maximum of merozoites may attain 12. They are more or less regularly rounded and constituted by a mass of protoplasm, including small masses of chromatin in varying number up to the maximum of twelve; the pigment is collected in one place and their diameter does not exceed 7 to 8 mikra. (Plate 3, Fig. 17, 18, 19).

When the division of the chromatin is completed the segmentation of the protoplasm takes place forming the merozoites.

The microgametocytes and female gametes are easily distinguished by their aspect. The macrogametes show a very regular outline and measure 6-8 mikra, the protoplasma

são sempre encontrados nas extremidades das células, aplicados de encontro ao núcleo.

Os gametos fêmeos adultos têm a forma esférica muito regular, medem 7 a 8 μ de diâmetro; o protoplasma é denso, bastante homogêneo e cora-se em azul intenso pelo Giemsa. Em um ponto qualquer delle, geralmente na periferia se encontra o núcleo, representado por diversas placas de cromatina reunidas umas às outras, formando uma massa única.

O pigmento se acha irregularmente distribuído por todo o parasita, sob forma de pequenas massas arredondadas, de colorido pardo escuro. Est. 3, fig. 20.

Os gametos masculinos são, em geral, maiores que os femininos; não raro atingem 9 μ de diâmetro, são arredondados como aqueles, porém não tão regularmente. O protoplasma cora-se muito fracamente em azul pelo Giemsa e o núcleo é constituído por delicado trama de bastonetes de cromatina que ocupa grande parte do protoplasma. O pigmento aparece sob forma de pequenos blocos alongados, pouco numerosos distribuídos no protoplasma. Est. 3, fig. 21.

Os gametos macho e fêmeo, muito claramente distintos, quando completamente desenvolvidos, já o são igualmente em período menos adiantado de evolução, se bem que menos nitidamente. Não têm então a forma arredondada e se parecem muito com as formas esquizogônicas; distinguem-se dellas, porém, pela presença de núcleo único e pela disseminação do pigmento no protoplasma.

As diferenças sexuais, si bem que igualmente menos acentuadas são já bastante patentes nelles.

being dense, homogeneous and intensely blue when stained by Giemsa's method. The nucleus is found in any place, mostly in the periphery, and constituted by several fragments of chromatin agglomerated in a single mass.

The pigment is irregularly distributed in the whole body forming small rounded masses of darkbrown hue. (Plate 3, Fig. 20).

The microgametocytes are generally larger than the female gamete attaining sometimes 9 *mikra*; their shape is less regularly rounded. The protoplasm stains a pale blue and the nucleus is formed by a few allongated chromatin masses, equally distributed in the cell plasm. (Plate 3, Fig. 21).

The two forms may be distinguished already in the less advanced periods though not quite as easily as in the adult stage. The earlier stages are not so regularly rounded and resemble much the schizogonic forms. They are however recognized by the single nucleus and by the dissemination of the pigment. Both the forms are also found always in the ends of the bloodcells and near to the nucleus.

Literatura

Dr. P. H. Simond, Contribution à l'étude des Hématozoaires endoglobulaires des Reptiles.

Ann. Inst. Pasteur T. XV., 1901, p. p. 319, 350.

A. Castellani and A. Willeg, Spolia Zeylanica, Vol. II. Part. VI p. p. 84, 1904. Observations on the Haematozoa of Vertebrates in Ceylon.

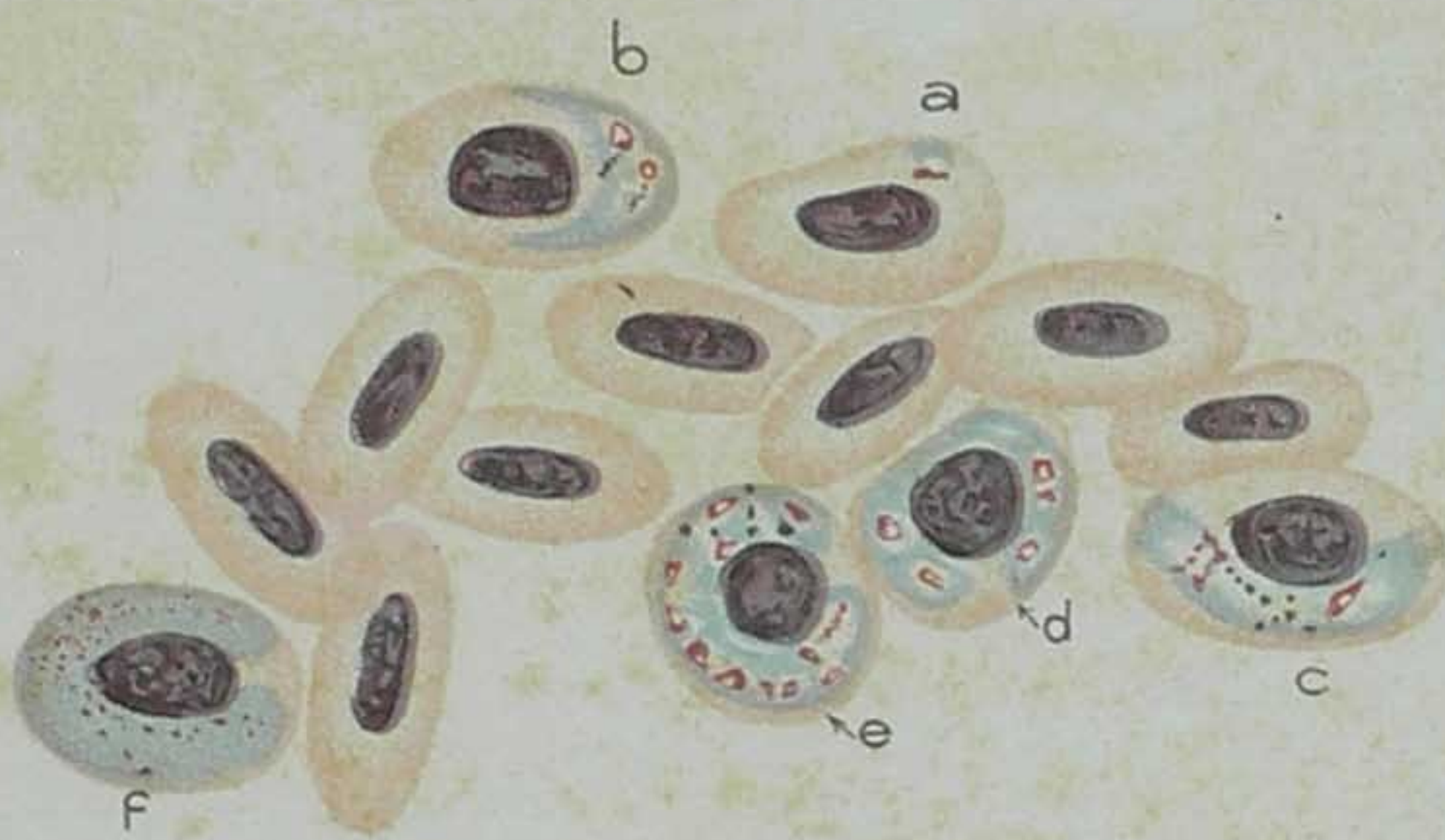
G. Bonet, Comp. Rend. de la Société de Biologie p. 43, 1904. Sur deux hémocytosaires pigmentés des reptiles.

C. M. Wenyon. Report of Travelling Pathologist and Protozoologist. Third. Report of the Wellcome Research Laboratories at the Gordon Memorial College Khartoum 1908. Plasmodium mabuiae pag. 146. Pl. XII, fig. 1, 12, 4.

Id. Id. Hemocystidium najae, pag. 150. Pl. XIV, fig. 1, 17, 21. Pl. XV, fig. 4, 5, 6.



11



12



13



10



9



8



7



6



5



4



3



2



1



14



18



15



19



16



20



17



21

CASRO SILVA