

TODDIA SP., "CORPÚSCULO PARANUCLEAR" NO
SANGUE DE LEPTODACTYLUS E BUFO DO
BRASIL — DESENVOLVIMENTO E
CITOQUÍMICA¹

NEIZE DE MOURA PEREIRA *
SYLVIO CELSO GONÇALVES COSTA **
MARIA AUXILIADORA DE SOUSA ***

Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Guanabara
(Com 39 figuras)

SUMÁRIO: O gênero *Toddia*, criado por França 1911, para um organismo encontrado em eritrócitos de um anfíbio anuro, tem estrutura particular e o problema de sua natureza (protozoário ou vírus) é discutido. Nossos resultados mostraram reações Feulgen e Verde Metila positivas, principalmente no início da infecção. Com o decorrer da infecção as partículas são, geralmente, maiores que aquelas observadas alguns dias após as inoculações, mas as reações citoquímicas citadas anteriormente são, em geral, negativas ou fracamente positivas. Os mesmos resultados foram obtidos quando empregamos Laranja de acridina para caracterização do DNA e esta técnica foi negativa para o RNA. Estudamos o desenvolvimento deste organismo e seus efeitos infecciosos foram confirmados por inoculações experimentais. As alterações no sangue do hospedeiro foram observadas e notamos que o núcleo dos eritrócitos é severamente alterado durante o desenvolvimento da infecção, que é geralmente, muito intensa, terminando com a morte do hospedeiro. As inoculações experimentais demonstraram a especificidade da infecção, e diante dos conhecimentos a respeito dos organismos deste gênero, discutimos o problema da criação de espécies.

TODDIA é um gênero criado por França 1911, cuja natureza foi discutida por Scorza e col. (1956) Marcquardt e col. (1967) e, recentemente, por Arcay de Peraza (1971 a, b e c). Como *Pirhemocytion*, um gênero a ele relacionado mas que não forma inclusões cristalóides no núcleo ou

citoplasma dos glóbulos vermelhos, *Toddia* apresenta posição taxonômica duvidosa.

O problema da relação destes dois gêneros com vírus, apontado por Stehbens & Johnston (1966) e Marcquardt (1967) ou com Protozoários, segundo o ponto de vista de Arcay

1 Recebido para publicação em 3 de novembro de 1972.

O presente trabalho é realizado, em parte, com auxílio do Conselho Nacional de Pesquisa.

* Bolsista do Conselho Nacional de Pesquisa.

** Pesquisador do Instituto Oswaldo Cruz e do CNPq.

*** Bolsista do Instituto Oswaldo Cruz.

Departamento de Zoologia; Laboratório de Protozoologia C.P. 926; Rio de Janeiro, Brasil.

de Peraza (1971 a, b e c) e Scorza & Boyer (1956) é um dos pontos que aqui será discutido. Este trabalho apresenta observações sobre *Toddia* encontrada em sangue de *Leptodactylus ocellatus* e *Bufo marinus* e nós enfatizamos o desenvolvimento observado com as inoculações experimentais bem como a citoquímica de ácidos nucleicos. A ocorrência deste parasito em *Bufo marinus* foi referida por Scorza (1956) em *Bufo marinus* da Venezuela. Scorza considerou como *Toddia* o parasito encontrado por Carini (1930) em *Leptodactylus pentadactylus* do Brasil.

Supomos que esta seja a primeira ocorrência em *Leptodactylus ocellatus* e *Bufo marinus* do Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Observamos 26 rãs *Leptodactylus ocellatus* e 23 sapos *Bufo marinus* provenientes dos Estados da Guanabara e do Rio de Janeiro (Tabela I) e mantidos em cativeiro no laboratório, sendo o sangue examinado em intervalos de 5 a 7 dias.

Os esfregaços de sangue foram observados após coloração com May Grünwald-

Giemsa. As lâminas utilizadas para reações citoquímicas foram fixadas em formalina ou álcool-éter e as seguintes reações realizadas: Reação de Feulgen, Verde Metila-Pironina, PAS.

Esfregaços corados pela Acridine Orange foram utilizados para microscopia de fluorescência com microscópio Olympus HLS-II e Toyota FM-200A.

Realizamos infecções experimentais utilizando inoculações intraperitoniais de sangue de animais infectados em anfíbios da mesma espécie e de espécie diferente. Utilizamos uma câmera Olympus modelo PM-7, uma câmera automática Orthomat, Leitz, para as microfotografias e micrômetro ocular Olympus para as medidas.

RESULTADOS

Entre as 26 rãs *Leptodactylus ocellatus* e os 23 sapos *Bufo marinus* examinados, somente duas rãs (7,7%) e 2 sapos (8,7%) mostravam infecção por *Toddia* França (1911) (tabela I).

Utilizando sangue de sapo parasitado por *Toddia* inoculamos 4 rãs e 5 sapos, mas, somente em sapos verificamos a transmissão da infecção, todas as rãs mostrando-se negativas (tabela II).

TABELA I

ANFÍBIOS EXAMINADOS PARA OBSERVAÇÃO DE TODDIA

ANFÍBIO	PROCEDÊNCIA	Número examinado	Número negativo	Número positivo
<i>Leptodactylus ocellatus</i>	GUANABARA . Manguinhos	13	11	2
	RIO DE JANEIRO . Rio Bonito	8	8	—
	PROCEDÊNCIA DESCONHECIDA	5	5	—
<i>Bufo marinus</i>	RIO DE JANEIRO . Piabetá	6	4	2
	. Vassouras	14	14	—
	PROCEDÊNCIA DESCONHECIDA	3	3	—
Total de Anfíbios	—	49	45	4

As rãs inoculadas com sangue de *Bufo* positivos, embora negativas para *Toddia*, apresentavam-se parasitadas por outros hematozoários: *T. rotatorium*, *Lankesterella alencari*, *Hepatozoon leptodactyli*, *Cytamoeba bacterifera*. Realizamos observações no sangue destas rãs, cinco, sete, onze e, numa delas, dezessete dias após as inoculações e os resultados foram sempre negativos para *Toddia* embora outros parasitos continuassem presentes.

As inoculações em sapo mostraram intenso parasitismo, em 2 casos

somente (tabela II) tendo sido diagnosticadas 4 dias após as inoculações. Apresentamos mais adiante a descrição completa da infecção. Em 3 casos, observamos a presença de parasitos cinco, sete e nove dias após as inoculações, porém em número muito pequeno, estando as células ligeiramente alteradas, talvez demonstrando resistência dos animais à infecção. No 9.º dia de observação desses 3 casos, praticamente, não havia parasitos. A tabela II ilustra nossos resultados.

TABELA II

INOCULAÇÕES EXPERIMENTAIS DE *TODDIA* EM *BUFO* E *LEPTODACTYLUS*

Espécie inoculada	Número de animais inoculados	Positivos fortes	Positivos fracos	Negativos
<i>L. ocellatus</i>	4	—	—	4
<i>B. marinus</i>	6	2	3	1
Total de anfíbios	10	2	3	5

Caracterizamos a seguir os diferentes aspectos da infecção natural e experimental por *Toddia*.

Infecção natural em *Leptodactylus ocellatus*

O animal naturalmente infectado apresentava outros parasitos no sangue (*T. rotatorium*, *Lankesterella alencari*, *Cytamoeba bacterifera*, *Dactylosoma ranarum*) e a tabela III ilustra a percentagem de infecção no decorrer das observações.

Com relação ao desenvolvimento da infecção natural por *Toddia* em um exemplar de *Leptodactylus ocellatus* a tabela IV ilustra o fenômeno.

Do 1.º ao 12.º dias de observação a maioria dos eritrócitos parasitados por *Toddia* tinha aspecto normal (figs. 1, 2, 3), com ligeiras alterações nucleares em alguns casos. O parasito apresentava-se como um grânulo redondo (figs. 1, 2) junto ao núcleo ou na matriz citoplasmática (figs. 1, 2, 3), corando-se em róseo pelo May Grünwald - Giemsa.

Alterações acentuadas, principalmente no núcleo (23,4 e 24,6%) de eritrócitos parasitados ocorreram no 22.º e 30.º dias de observação (figs. 4 a 19). Os núcleos apresentavam-se arredondados, aumentados (tabela V), tendo o aspecto geral de núcleo em

cariólise. O citoplasma das células parasitadas, mostrava coloração normal ou era levemente escuro. Os parasitos, redondos ou ovais (fig. 19) tinham aspecto difuso em muitos casos (figs. 11, 14, 18).

TABELA III

PERCENTAGEM DE INFECCÃO POR HEMOPARASITOS DIFERENTES DE *TODDIA* EM UM EXEMPLAR DE *LEPTODACTYLUS OCELLATUS*

Infecção no sangue	% nos dias de observação			
	1.º	12.º	22.º	30.º
<i>L. alencari</i>	1,90*	1,90*	1,09* ₁	1,60* ₁
<i>T. rotatorium</i>	0,07	0,10	—	—
<i>D. ranarum</i>	0,40	0,20	—	1,2
<i>C. bacterifera</i>	0,10	0,10	—	—
<i>Haemobartonella</i>	0,10	—	—	—

* 1,6% de formas exoeritrocitárias.

*₁ somente formas exoeritrocitárias.

Verificamos a presença de inclusões esferóides (figs. 7, 15, 18,19) ou cristalóides, tendo os corpúsculos cristalóides geralmente 6 lados (figs. 7, 8, 10, 17). Muitas vezes era difícil determinar o número de lados desses corpúsculos que também apresentaram 5, 7, ou mais lados (figs. 11, 12, 13). Os cristalóides, freqüentemente citoplasmáticos, alteravam bastante o aspecto das células (figs. 4 a 6, 9 a 15, 18 e 19) que mostravam núcleos deslocados e formas muitas vezes aberrantes. Cristalóides nucleares (também com 6 lados) foram

observados em percentagem muito menor (1,2% no final da infecção) (figs. 7, 8 e 17). Com o desenvolvimento da infecção houve, em geral, aumento de tamanho do parasito (tabela IV), tendo, os maiores, aspecto difuso (figs. 11, 14, 18) e apresentando, em alguns casos, espaços claros no seu interior. Os parasitos atingiram cerca de 3,07 μ * (corpúsculo redondo) e cerca de 6,89 μ */2,99 μ * (corpúsculo sem forma definida) sendo interessante salientar a presença de alguns parasitos com 0,74 μ * no 30.º dia de observação.

μ * = micra.

Eritrócitos parasitados ou não mostravam-se muito alterados no final da infecção quando encontramos somente 7,7% de eritrócitos normais (fig. 16).

Infecção múltipla em eritrócito também ocorreu, porém muito raramente (0,8% no final da infecção) (fig. 15).

TABELA IV

ASPECTOS DA INFECÇÃO DE *LEPTODACTYLUS* *OCELLATUS* POR *TODDIA*

Dias de Observação	Infecção (%)	Parasito		Inclusão	
		Forma	Tamanho médio (μ^*)	Tamanho médio (μ^*)	%
1.º	0,1	Redondo	1,08	—	—
12.º	1,5	Redondo	1,02	—	—
22.º	32,4	Redondo	1,96	8,78/6,67	8,2 × 1
		Oval	3,73/2,40 [×]		
30.º	36,1	Redondo	2,08	9,88/7,80	12,4 × 2
		Oval	4,52/3,05 [×]		

× uma forma encontrada

×1 0,3% de inclusão nuclear

×2 1,2% de inclusão nuclear

TABELA V

TAMANHO (EM μ^*) DE ERITRÓCITOS NORMAIS E PARASITADOS POR *TODDIA* EM *L. OCELLATUS*

Eritrócito	Comprimento da Célula (c)	Largura da Célula (l)	c/l*	Comprimento do Núcleo (c)	Largura do Núcleo (l)	c/l*
Normal	15,31	9,24	1,65	6,02	4,23	1,42
Parasitado	14,05	9,30	1,51	6,47	5,85	1,16

* c/l — relação comprimento/largura.
 μ^* = micra.

Infecção natural em *Bufo marinus*

O animal permaneceu no laboratório cerca de 35 dias, quando foi autopsiado, sendo feitas observações no 1.º, 6.º, 15.º, 25.º, e 35.º dias. Tabela VI ilustra o desenvolvimento do parasitismo neste período.

Como na infecção de *Leptodactylus*, as alterações na célula hospedeira ocorreram principalmente no núcleo (figs. 20, 21, 22, 28) que tinha aspecto aumentado e arredondado. A cromatina nuclear, dispersa ou em gru-

mos, (figs. 20, 28) apresentou, muitas vezes, expansões para o citoplasma e depósito na membrana nuclear. Tabela VII ilustra os tamanhos médios das células e dos núcleos de eritrócitos parasitados em relação às células normais. Núcleos deslocados e com membrana pouco nítida também foram observados (figs. 21, 23).

Essas alterações foram diminuindo com o decorrer da infecção, havendo no final, muitas células parasitadas com núcleos de aspecto normal (fig. 31).

TABELA VI

DESENVOLVIMENTO DA INFECÇÃO NATURAL DE *TODDIA* EM *BUFO MARINUS*

Dias de Observação	1.º	6.º	15.º	25.º	35.º
% de infecção	36	27	22,9	14,60	12,16
% de cristais	0,73	1,83	0,30	1,09	1,09

TABELA VII

TAMANHO EM μ^* DE ERITRÓCITOS NORMAIS E PARASITADOS POR *TODDIA* EM *BUFO MARINUS*

Tipo de célula	Comprimento da Célula (c)	Largura da Célula (l)	c/l*	Comprimento do Núcleo (c)	Largura do Núcleo (l)	c/l*
Eritrócitos parasitados	18,01	13,67	1,31	7,18	6,51	1,08
Eritrócitos normais	19,60	13,64	1,43	7,57	5,22	1,45

* c/l — relação comprimento/largura.
 μ^* = micra.

As inclusões coradas em rosa muito pálido com Giemsa eram em geral cristalóides com 4 ou 8 lados (figs. 27, 28, 30) e, as vezes, 6 e 7 lados (fig. 20) sendo principalmente nucleares, havendo, entretanto, cristais citoplasmáticos sem coloração, geralmente em número muito pequeno e no início da infecção (figs. 22 e 23.) As inclusões situavam-se predominantemente em núcleos de células des-

truídas, as quais não apresentavam citoplasma (figs. 20, 27, 28, 30). Tabela VI mostra a percentagem dessas inclusões, em maior número no 6.º dia de observação (1,83%) e a tabela VIII ilustra o tamanho médio apresentado durante a infecção. As inclusões retangulares, com 6 lados e com mais de 8 lados que foram encontradas, mediam respectivamente 9,96/8,3 μ^* ; 8,3/6,39 μ^* e 9,79 μ^* .

TABELA VIII

TAMANHO MÉDIO DAS INCLUSÕES CRISTALÓIDES NO SANGUE DE *BUFO MARINUS*

Tipo de inclusão	Tamanho (μ^*)	Faixa de variação (menor-maior) (μ^*)
Com 4 lados	4,74	1,58 — 8,3
Com 8 lados	6,21	3,98 — 9,46

Os parasitos mostravam aspecto granular redondo, corando-se em rosa pelo Giemsa. Esta coloração se apresentou bem mais clara no final da infecção. Foram notados parasitos com três grânulos, de aspecto semelhante a um triângulo e pouquíssimos parasitos retangulares (um em cada lâmina observada com tamanho médio de 1,42/1,01 μ^*). Os corpúsculos localizavam-se na matriz citoplasmática ou junto ao núcleo principalmente,

quando muito pequenos. A presença de 2 e 3 parasitos na mesma célula ocorreu raríssimas vezes (fig. 22). Observamos em um dos casos a presença do parasito em leucócito (figs. 24 e 25).

Tabela IX mostra o tamanho médio dos corpúsculos no decorrer da infecção notando-se que, embora maiores no 6.º dia, eles, em geral, apresentaram-se diminuídos.

μ^* = micra.

TABELA IX

TAMANHO MÉDIO EM μ^* DE *TODDIA* SP. ENCONTRADA EM *BUFO MARINUS*

Dias de observação	1.º	6.º	15.º	25.º	35.º
Tamanho (diâmetro)	1,38	1,78	1,33	1,24	1,09
Faixa de variação (Menor-Maior)	0,74 - 2,40	0,91 - 2,65	0,83 - 2,15	0,74 - 1,57	0,58 - 1,90

Infeção experimental de *Toddia* em *Bufo marinus*

Conforme afirmamos no início deste trabalho, 4 rãs e 5 sapos foram inoculados com sangue de sapo parasitado por *Toddia*, mas somente dois sapos mostravam-se infectados intensamente por este parasito (Tabela II).

Tabela X ilustra o desenvolvimento da infeção experimental.

Cs primeiros parasitos surgiram cerca de 4 dias após a inoculação, numa taxa de 1,8% de eritrócitos parasitados. Eram redondos (fig. 32) corando-se em róseo com Giemsa e localizando-se no citoplasma dos glóbulos vermelhos, geralmente jovens (eritroblastos) e com aspecto normal. Não encontramos corpúsculos cristalóides nesta ocasião.

Cerca de sete dias após a inoculação, a taxa de parasitismo era de 66% sendo que 50% dos glóbulos vermelhos parasitados mostravam acentuadas alterações nucleares, sendo também encontrados núcleos arredondados (figs. 33, 34, 36, 37) aumentados

no sentido da largura, (Tabela XI) com cromatina nuclear esparsa (figs. 33, 34, 36) característica de núcleo em cariólise. Verificamos a ocorrência de núcleos centrais ou deslocados (figs. 33 a 35), sendo o último caso associado à presença de cristais citoplasmáticos. As inclusões encontradas, geralmente cristalóides com 8 lados, eram predominantemente citoplasmáticas (6%) (figs. 33, 35, 36) sendo observados apenas 2% de cristalóides nucleares (figs. 34, 35, 38). Em muitos casos foi difícil verificar a forma real da inclusão que também mostrou aspectos esferóides (figs. 33-36).

O citoplasma das células parasitadas apresentou-se, em certos casos, escurecido (fig. 35 a 37) principalmente em células com parasitos muito grandes.

Alterações no núcleo e no citoplasma da célula hospedeira (figs. 35 e 37) ocorreram em 10% das células parasitadas, sendo que 23% de células não parasitadas também mostravam-se alteradas.

μ^* = micra.

Os parasitos apresentaram-se redondos ou ovais (figs. 33 a 35 e 38), sendo bem maiores que os encontrados no início da infecção (Tabela X)

TABELA X
DESENVOLVIMENTO DE *TODDIA* EM *BUFO MARINUS*
(INFEÇÃO EXPERIMENTAL)

Dias após inoculação	Forma do parasito	Tamanho médio (μ^*)	Porcentagem de infecção	Tamanho da inclusão (μ^*)	Porcentagem de cristal
4	redonda	1,8	1,8	—	—
7	redonda	2,4	62,70	8,3/8,1	8*
	oval	3,6/2,6	3,30		

* 2% nuclear e 6% citoplasmático.

e mostrando uma faixa de variação de tamanho de 1,2 a $3,5\mu^*$ (parasitos redondos) tendo o maior parasito encontrado $4,3/2,9\mu^*$ (corpúsculo oval). Localizavam-se livres na matriz citoplasmática ou junto ao núcleo, e tinham aspecto granular compacto ou difuso (figs. 32 a 38) em certos casos, apresentando contorno nítido com porção clara central.

Cerca de 11 dias após a inoculação, quando o animal morreu, as células parasitadas e não parasitadas encontravam-se intensamente alteradas. O tamanho médio dos parasitos nesta ocasião era de cerca de $2,8\mu^*$ (faixa de variação $1,0/4,4\mu^*$), sendo impossível determinar a porcentagem de infecção nesta ocasião, devido a precariedade das preparações obtidas.

TABELA XI
MEDIDAS EM μ^* DE ERITRÓCITOS NORMAIS E PARASITADOS DE
BUFO MARINUS INOCULADO COM *TODDIA*

Tipo	Comprimento (c)	Largura (l)	c/l*	Comprimento do Núcleo (c)	Largura do Núcleo (l)	c/l*
Eritrócito normal	18,3	12,5	1,46	7,30	5,30	1,37
Eritrócito parasitado	17,1	12,9	1,32	8,16	7,56	1,07

* c/l — relação comprimento/largura.
 μ^* = micra.

Reações citoquímicas em *Toddia*

As reações citoquímicas foram realizadas somente com *Toddia* de sapo.

Utilizamos reações para caracterização de polissacarídeos (Reação PAS) e de ácidos nucleicos (Reação de Feulgen, Verde Metila-Pironina e a técnica de laranja de acridina para microscopia de fluorescência).

A reação PAS foi sempre negativa. Encontramos resultados positivos para a reação de Feulgen e a de verde metila, sendo a reação mais forte nos corpúsculos menores. A microscopia de fluorescência, positiva também para o DNA, confirmou estes resultados. (fig. 39).

DISCUSSÃO

Os gêneros *Toddia* e *Pirhemocytion* apresentam posição sistemática duvidosa. Arcay de Peraza (1971) considera *Toddia* com afinidade com os Dactylosomídeos, sendo comparável aos Piroplasmídeos dos homeotérmicos. Scorza (1956), numa revisão do gênero confirma sua natureza parasitária através de experiências, considerando-o, também, um gênero do phylum Protozoa. Esses autores referem-se à presença de citoplasma e à ocorrência de esquizogonia nestes parasitos, embora as fotografias apresentadas sejam pouco esclarecedoras em relação aos detalhes descritos.

Dodin e Brygoo (1960), demonstraram que *Pirhemocytion* é retido em filtro L₃ e apresenta atividade para a succino desidrogenase e para citocromo oxidase. Em relação ao fato dos *Pirhemocytion* não terem sido filtra-

dos, Stehbens (1966) lembra que as partículas podem ter sido retidas nos glóbulos vermelhos, mostrando a importância da destruição total das células do hospedeiro nessas experiências, como demonstraram Allbriton e Parker (1962), trabalhando com *Anaplasma*. Do mesmo modo relembra que a técnica de filtração usada pelos autores se acha em desuso devido a adsorção de partículas de vírus em sua superfície (segundo Rhodes, A. J. e cols.).

Marquardt (1967) descreve *Toddia* na cobra *Agkistrodon piscivorus leucostoma*. Num detalhado estudo do organismo, confirma seu grande poder de destruição do núcleo da célula hospedeira. O autor não encontrou presença de citoplasma nestes organismos e observou que as inclusões, inicialmente globosas, tornam-se em geral cristalóides, o que sugeria um grande relacionamento, entre *Pirhemocytion* (inclusões globóides) e *Toddia* (inclusões cristalóides).

Stehbens (1966), em estudo de ultra-estrutura de *Pirhemocytion* encontrou estruturas poligonais no local que corresponderia ao corpo do parasito, o que o fez considerá-lo como uma "fábrica" de vírus. Blanc e Ascione (1956) já haviam sugerido relacionamento de *Pirhemocytion* com vírus.

Marquardt (1967) tendo encontrado Reação Feulgen positiva para o parasito por ele estudado, sugere que *Pirhemocytion* e *Toddia* sejam estruturas viróticas do tipo vírus DNA.

Estudos de microscopia eletrônica bem como bioquímicos ou citoquímicos, principalmente os relacionados à

pesquisa de enzimas, poderão esclarecer este problema porém, de acordo com os dados atuais, concordamos com **Mackerras** (1961) e **Marquardt** (1967) quando dizem que não existem dados suficientes para caracterização específica nesses dois gêneros.

Nossas experiências de inoculações experimentais confirmaram ação infecciosa do organismo sugerindo uma transmissão direta e uma especificidade de hospedeiro, pois só conseguimos transmitir a infecção de sapo para sapo e não de sapo para rã. Notamos também que a infecção experimental foi mais intensa que a infecção natural.

Comparando as infecções, natural e experimental em sapo, observamos que, na infecção natural, o número de parasitos foi diminuindo com o tempo, apesar de que o animal ao morrer, mostrava sinais de caquexia intensa e ascite, que poderia estar relacionada à presença do parasito ou ser consequência do cativeiro. A diminuição da infecção talvez esteja relacionada a uma resistência natural do hospedeiro, o que explicaria a percentagem baixa de hospedeiros parasitados naturalmente.

Pessoa (1968-1969) conseguiu infectar a cobra *Helicops modesta* com *Toddia* de cobra *Tomodon dorsatus*, mostrando ausência de especificidade de hospedeiro no caso por ele observado. Nas nossas observações houve especificidade nas infecções.

Tanto em rãs como em sapos predominaram alterações no núcleo da célula hospedeira que, em geral, se apresentavam cariolíticos.

Inclusões cristalóides estavam presentes em *Toddia* de rãs e de sapos, tendo sido encontrados cristais nucleares e citoplasmáticos.

É interessante o fato de que na infecção natural de sapos houve predominância de cristais nucleares, enquanto que a inoculação de sangue deste mesmo animal em outro exemplar desenvolveu infecção em que havia predominância de cristais citoplasmáticos. **Arcay de Peraza** (1971) e **Scorza** (1956) apresentam classificação de espécies do parasito baseando-se em tipo de hospedeiro, forma e tipos de cristais, tamanho do parasito, localização dos cristais, etc. O fato de termos encontrado para o mesmo parasito, predominância de localização de cristais, ora no núcleo ora no citoplasma, nas inoculações experimentais que realizamos, entra em choque com um dos critérios considerado específico. Por outro lado encontramos cristais de diferentes formas no mesmo hospedeiro o que também torna pouco válido este critério de classificação. A variação de tamanho do parasito durante a infecção cria outro ponto discutível para a classificação de espécies, visto que dependendo do tempo da infecção há variabilidade no tamanho do corpúsculo o que poderia levar a uma conclusão errada, ao se fazer uma classificação.

Os resultados obtidos com as reações citoquímicas em *Toddia* de *Bufo marinus* demonstram a existência de DNA nesses parasitos. A diminuição de positividade para o DNA com o decorrer da infecção, talvez esteja relacionada a uma despolimerização desta substância.

A intensidade da infecção está provavelmente relacionada à resistência do hospedeiro e enquanto não são realizados estudos mais precisos, concordamos com Marquardt (1967) de que, provavelmente, *Pirhemocytion* e *Toddia* são organismos afins necessitando-se de maiores investigações para se estabelecer o relacionamento de tais organismos com os vírus ou com os protozoários.

SUMMARY

Toddia sp. a paranuclear corpuscle in the blood of *Leptodactylus* and *Bufo* of Brazil.

Toddia, a genus created by França 1911 for an organism found in the erythrocytes of an anuran amphibian, has a particular structure and the problem of its viral relationship or protozoa nature is an important point which has recently been discussed.

Attempt to resolve this problem must be made using ultrastructure and cytochemical studies. Our results have shown a Feulgen positive reaction and a Methyl-Green positive reaction for this organism, chiefly in the beginning of the infection. At the end of the infection the particles are greater than that in the beginning

but the reactions above cited are generally weakly positive or negative. We have also employed the Acridine orange method in the characterization of DNA and the results are positive too. Further histochemical studies are necessary to determine the true nature of the material observed in this study.

We have also studied the development of this organism and its pathogenic effects have been confirmed by experimental inoculations. The alterations in the blood of the host were observed and we noted that the nucleus of the red blood cells is severely disturbed during the development of the infection. The experimental inoculations (in *Leptodactylus* and *Bufo*) have demonstrated specific infectivity which is generally hard, finishing with the death of the host.

The taxonomic aspects related to this genus are discussed and the authors agree to the point of view of Mackerras 1961, and Marquardt 1967, about the identity of *Pirhemocytion* and *Toddia*. We need more research to establish the viral nature of this organism.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Dr.^a Monika Barth a oportunidade da realização de parte das microfotografias em seu laboratório.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 — ALLBRITTON, A. R. & PARKER, L. T., 1962, — Filtration of the infective agent of Bovine anaplasmosis. *Am. J. Vet. Res.*, 23:809.
- 2 — ARCAY DE PERAZA, L., NAZIR, P. & DIAZ, M. T., 1971, — "The paranuclear corpuscles" in poikilothermal vertebrates. I. Description of a new specie of *Toddia* from *Iguana iguana* in Venezuela, *Acta Biol. Ven.*, 7(2):191-199, 11 figs.
- 3 — ARCAY DE PERAZA, L. & McLURE, M. T., 1971, — "The paranuclear corpuscles" in poikilothermal vertebrates. II. Description of a new species of *Toddia* in *Eletrophorus electricus* (electric eel) with an expansion of the key to the species of the genus *Toddia* in poikilothermal vertebrates. *Acta Biol. Ven.*, 7(2):201-209, 6 figs.
- 4 — ARCAY DE PERAZA, L. & ROCA, C. D. M., 1971, — "The paranuclear corpuscles" in poikilothermic vertebrates: description of a new species of *Pirhemocytion* in *Iguana iguana* of Venezuela with remarks on the nature of these organisms and their relation to allied parasites. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 69(1): 57-70.
- 5 — BLANC, G. & ASCIONE, L., 1959, — Sur un parasite endoglobulaire du lézard *Eremias guttulatus olivieri* Audoin de la région de Marrakech. *Arch. Inst. Pasteur Maroc.*, 5:661-665.
- 6 — CARINI, A., 1930, — Presence de corpuscules de nature parasitaire probable (*Bertarella leptodactyli*) dans les hematies du *Leptodactylus pentadactylus*. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 103 (1):1312-1313.
- 7 — FRANÇA, C., 1911, — Notes sur les hematozoaires de la Guinée Portugaise. *Arch. Inst. Camera Pestana*, 3:229-238.
- 8 — MACKERRAS, M. J., 1961, — The Haematozoa of Australian Reptiles. *Aust. J. Zool.*, 9(1):61-122.
- 9 — MARQUARDT, W. C. & YAEGER, R. G., 1967, — The structure and taxonomic status of *Toddia* from cottonmouth snake *Agkistrodon piscivorus leucostoma*. *J. Protozool.*, 14(4):726-731, 11 figs.
- 10 — PESSOA, S. B., 1968-1969, — Experiências sobre a transmissão de hemoparasitas a animais de sangue frio. *An. Fac. Med. Univ. Fed. Paraná*, 11-12(1-2):21-25, 4 figs.
- 11 — RHODES, A. J. & van ROOYEN, C. E., 1958, — *Textbook of Virology*, 3rd edition, p. 38, Williams & Wilkins, Baltimore.
- 12 — SCORZA, J. V. & BOYER, C. D., 1956, — Consideraciones sobre los llamados corpusculos paranucleares. Revision del genero *Toddia* França, 1911 con adición de tres nuevas especies. *Bol. Venez. Lab. Clin.*, 1(3-4):199-210.
- 13 — STEHBENS, W. & JOHNSTON, M. R. L., 1966, — The viral nature of *Pirhemocytion tarentolae*, *J. Ultrastructure Research*, 15:543-554, 12 figs.

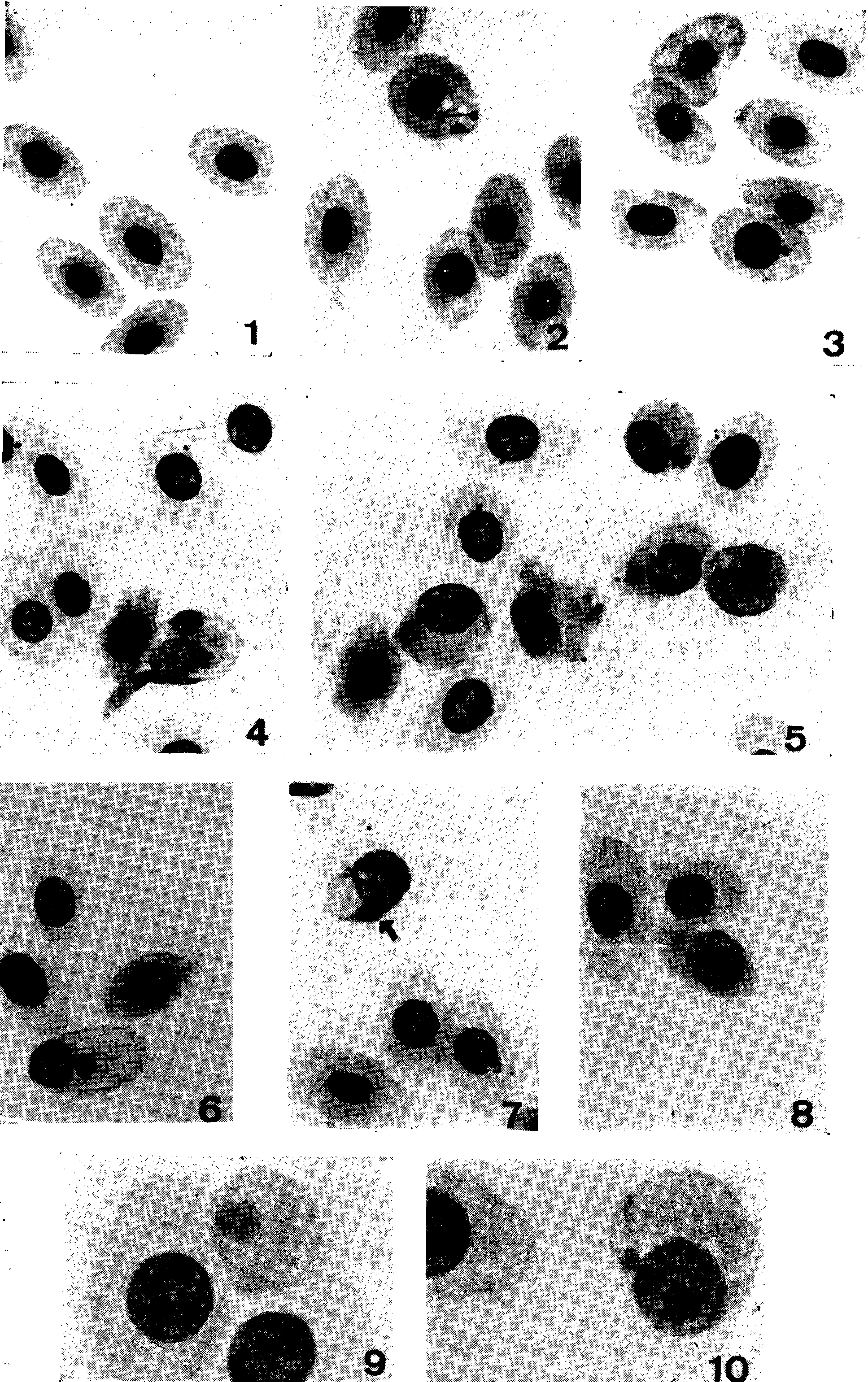
ESTAMPA I

Figs. 1 a 10: Infecção natural por *Toddia* em *Leptodactylus ocellatus*; aumento 1000 x (exceto figs. 8 e 9, 2000 x).

Fig. 1 — (1.º dia de observação), *Toddia* redonda em glóbulo vermelho com aspecto normal..

Figs. 2 e 3 — (12.º dia de observação): fig. 2 — *Toddia* e *Dactylosoma* na mesma célula; fig. 3 — *Toddia* junto ao núcleo, notando-se arredondamento e alteração no núcleo da célula parasitada.

Figs. 4 a 10 — (22.º dia de observação): fig. 4 — *Toddia* difusa em célula com núcleo arredondado e cromatina esparsa e apresentando citoplasma alterado, com inclusão cristalóide(?) abrangendo todo o tamanho da célula; *Lankesterella* extracelular junto à célula parasitada; figs. 5 e 6 — células parasitadas muito alteradas, com inclusões cristalóides citoplasmáticas provocando deslocamento do núcleo; fig. 7 — *Toddia* (seta) em célula muito alterada e com inclusão cristalóide no núcleo (com 6 lados) e no citoplasma; fig. 8 — *Toddia* em célula com inclusão cristalóide nuclear; figs. 9 e 10 — células parasitadas com *Toddia* e inclusão cristalóide citoplasmática. Na figura 9, *Toddia* difusa localizada em célula sem núcleo.



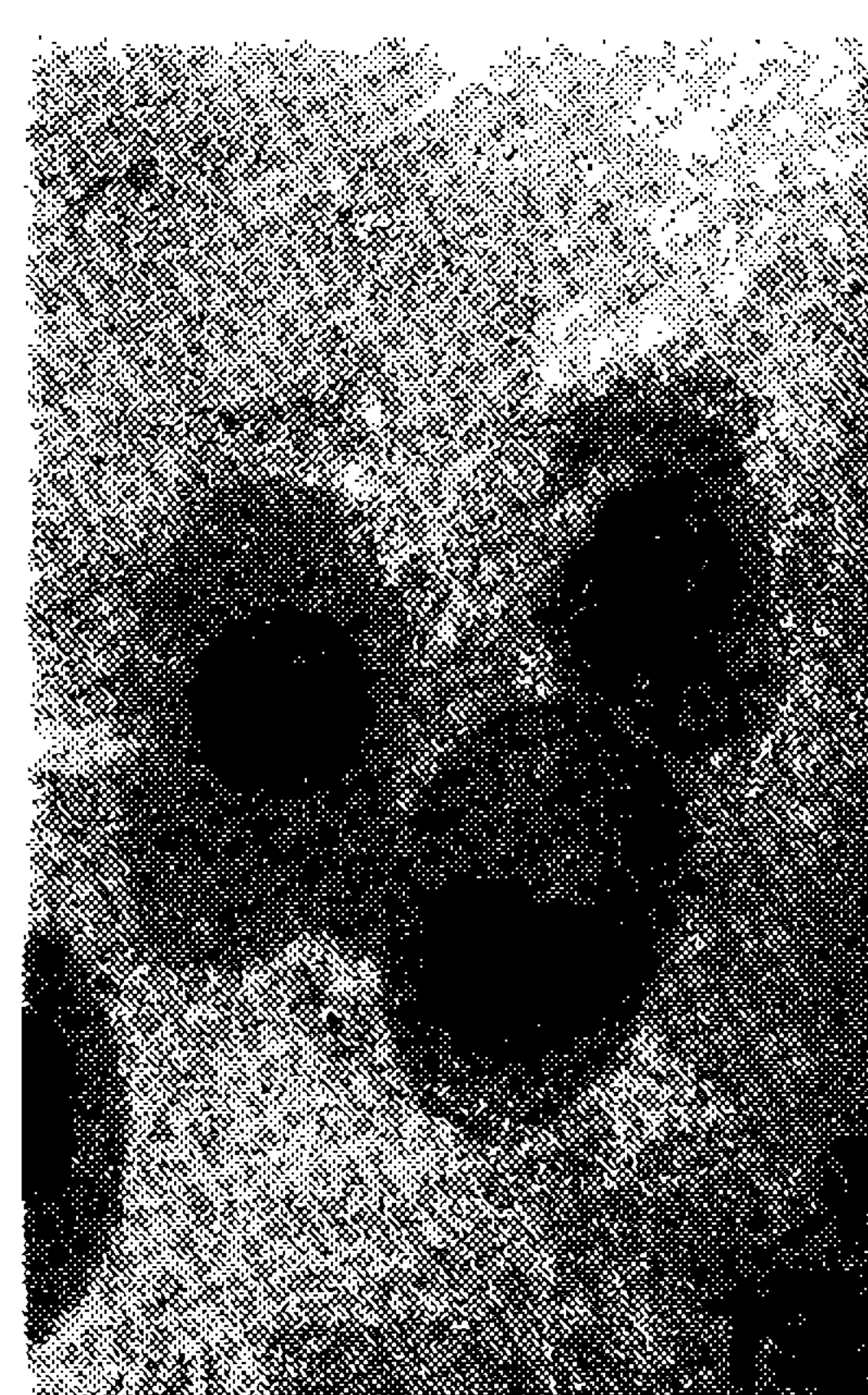
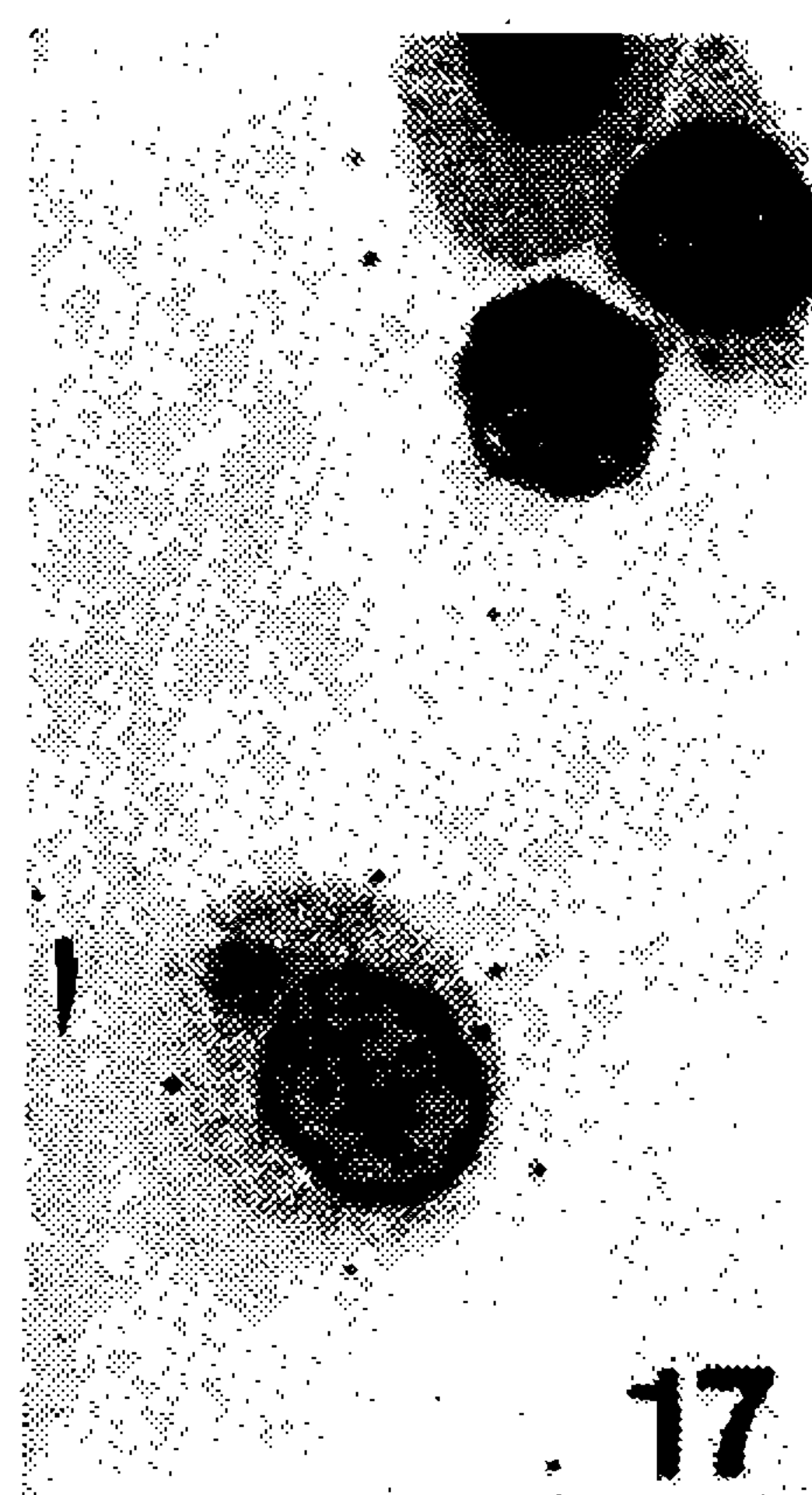
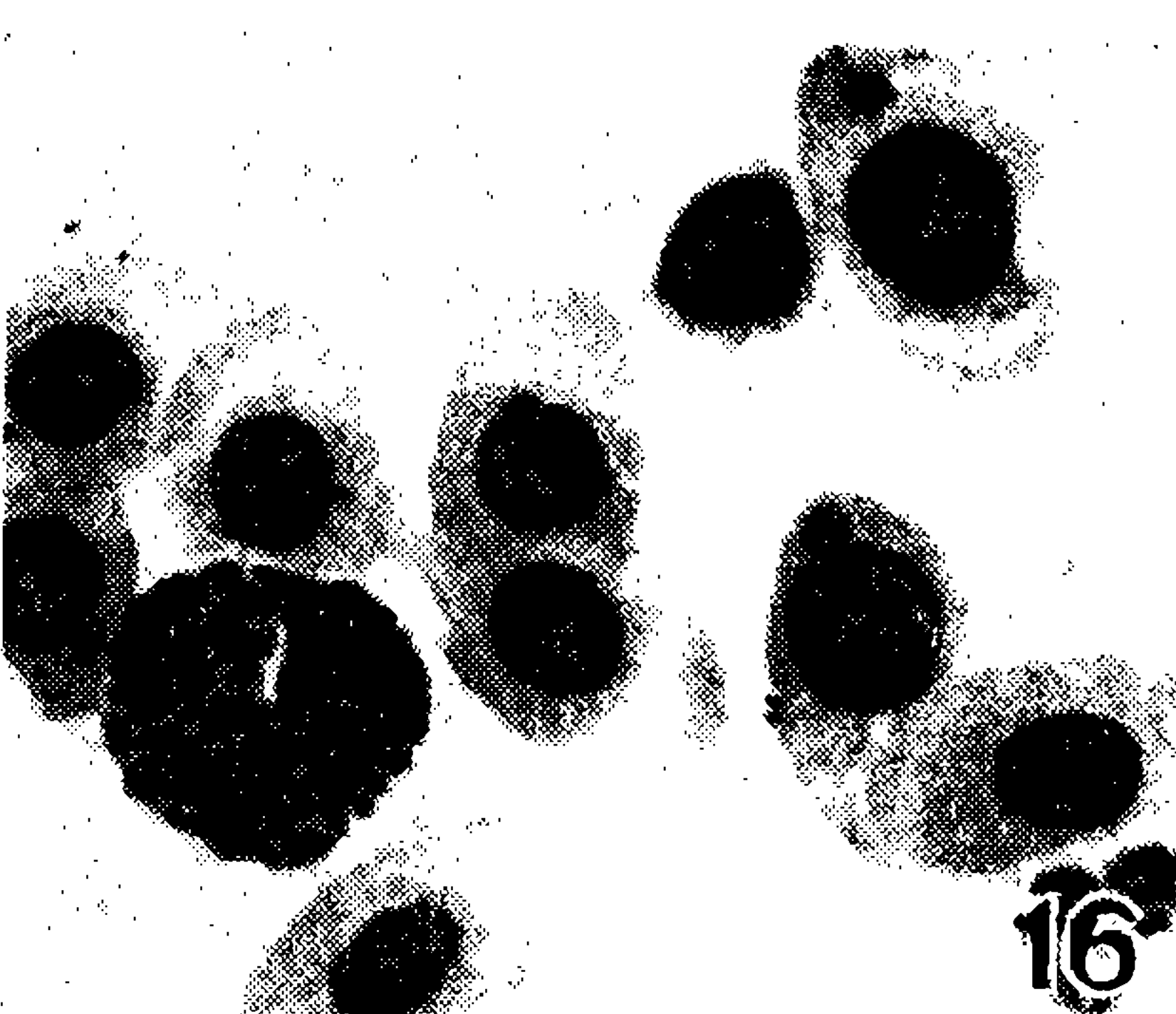
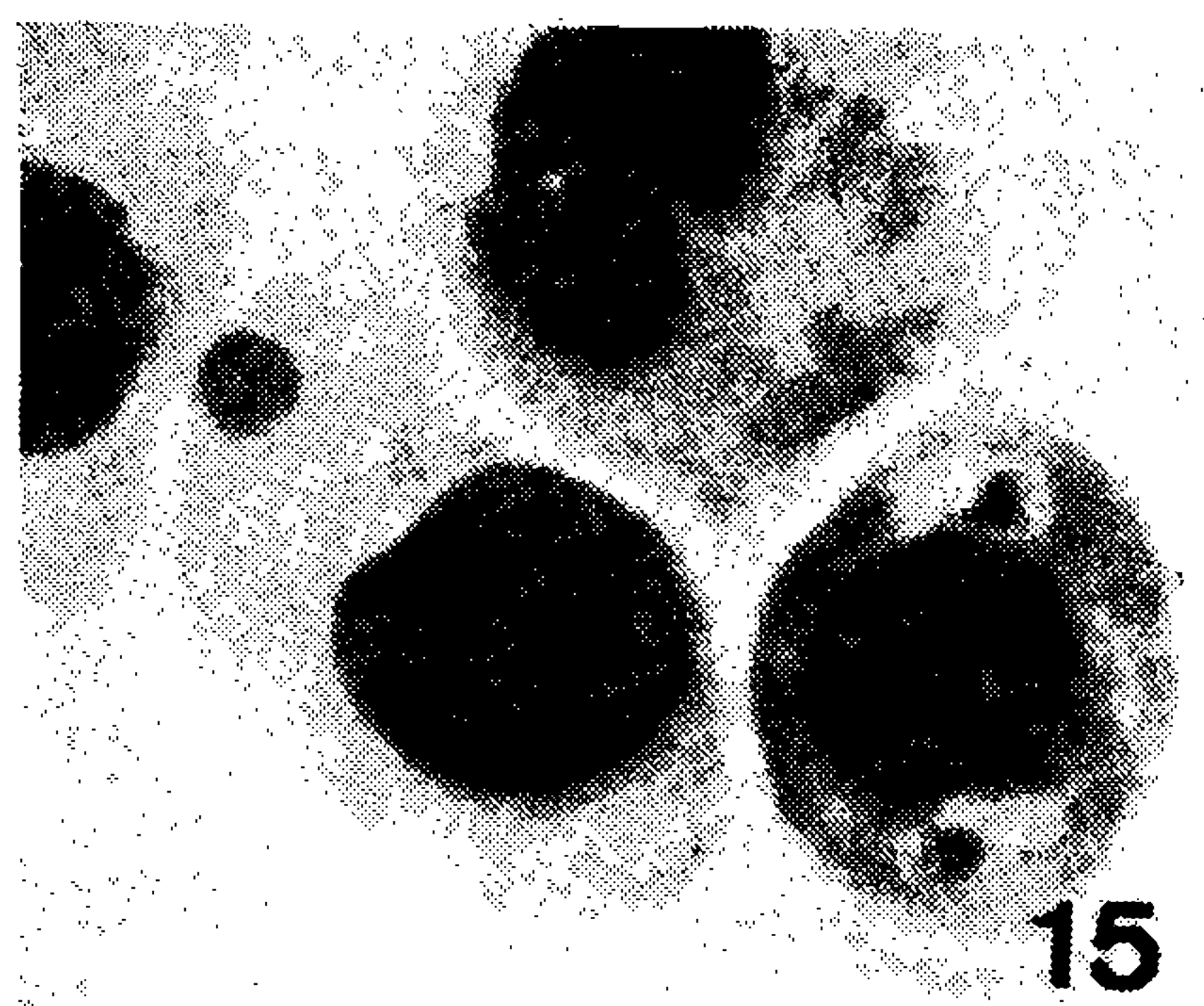
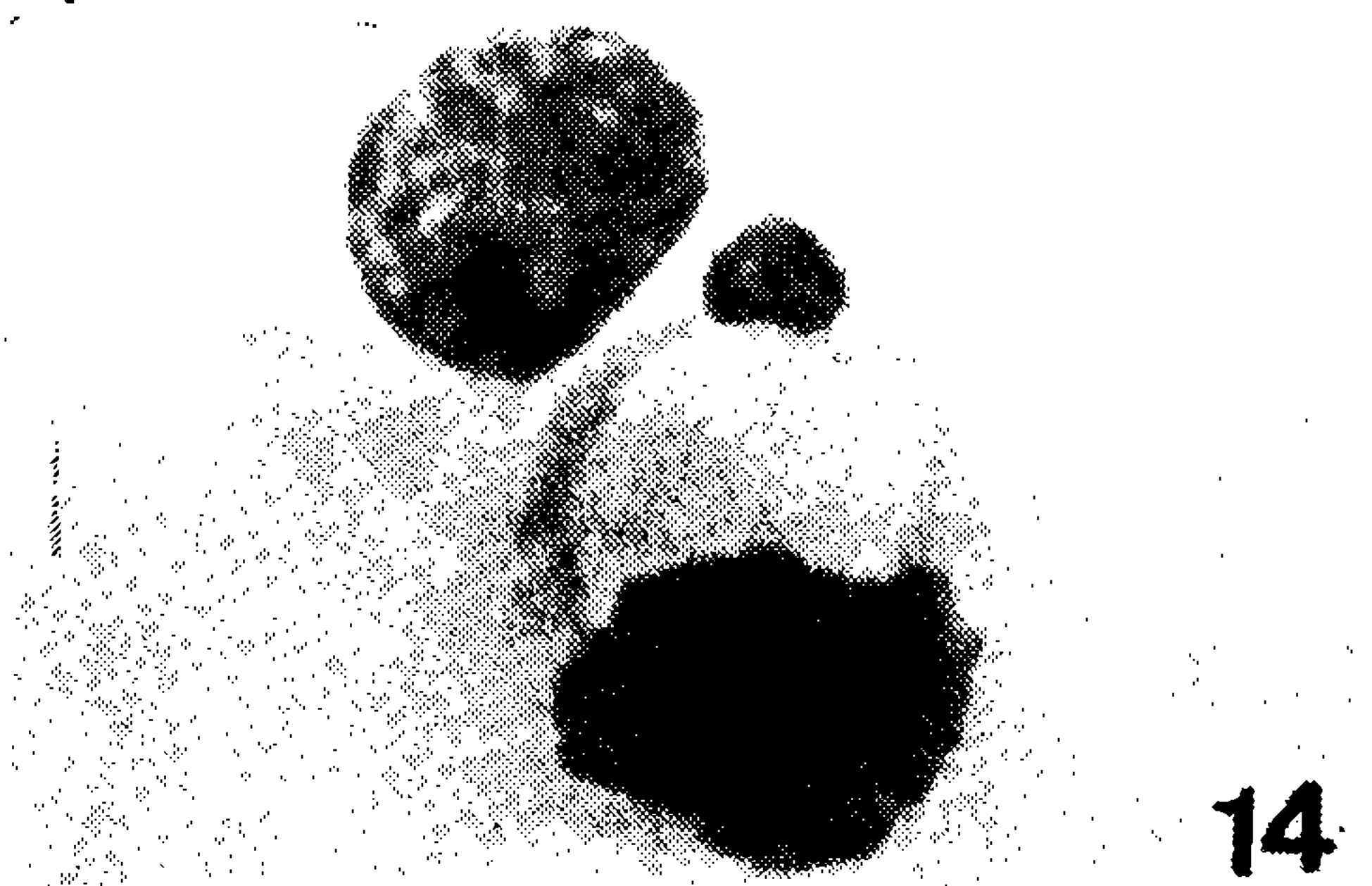
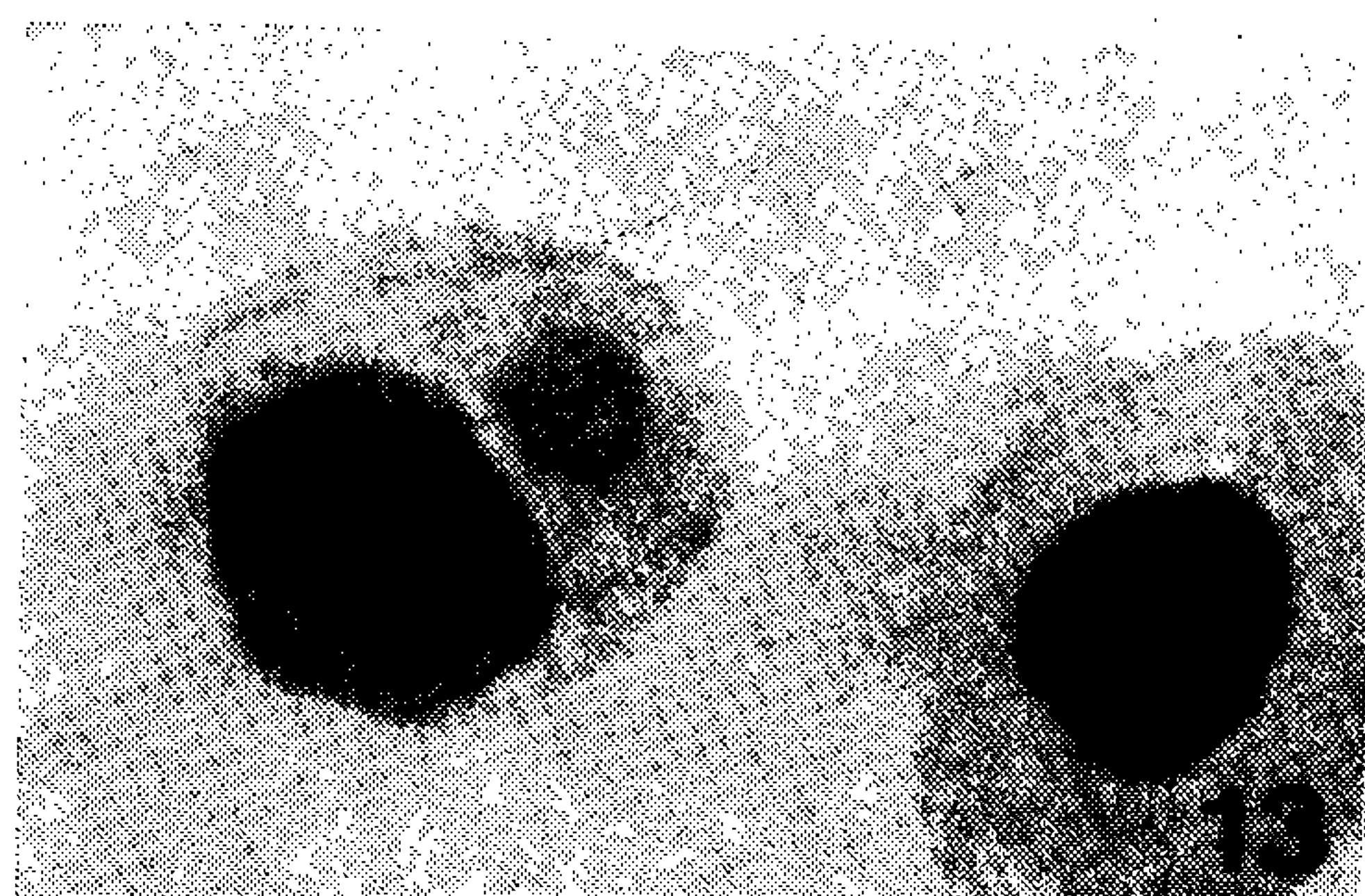
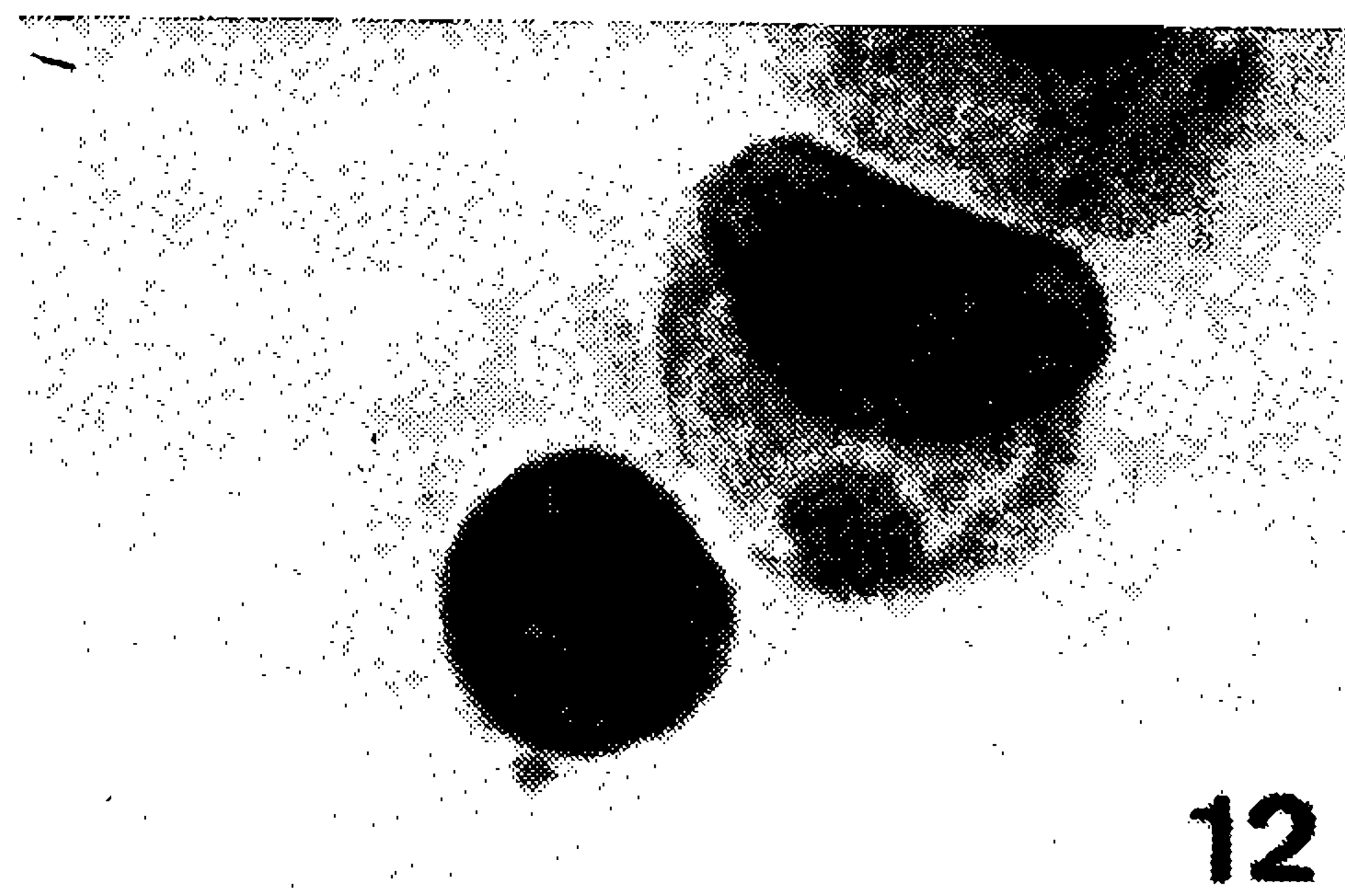
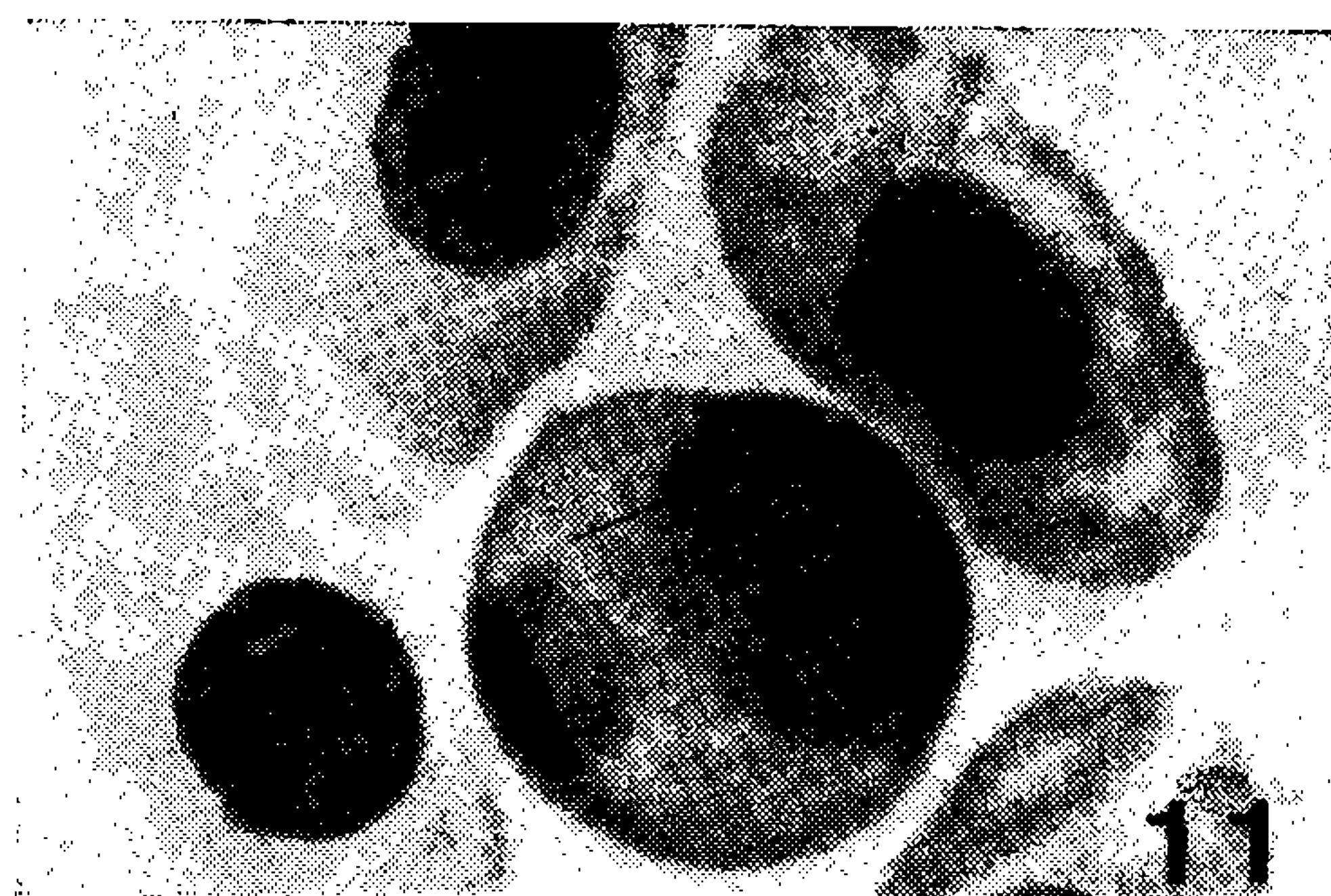
ESTAMPA II

Figs. 11 a 19: Infecção natural por *Toddia* em *Leptodactylus ocellatus*; aumento 2000 x (exceto figs. 16 a 19, 1000 x).

Figs. 11 a 15 — (22.º dia de observação): diferentes aspectos da alteração celular provocada pela *Toddia* em glóbulos vermelhos contendo inclusão cristalóides citoplasmáticas. Inclusão em célula da fig. 15. bem como célula parasitada por duas toddias.

Figs. 16 e 17 — (30.º dia de observação): fig. 16 — aspecto geral da alteração nuclear dos glóbulos vermelhos parasitados e não parasitados; fig. 17 — *Toddia* em glóbulo vermelho alterado com núcleo contendo inclusão cristalóide;

Figs. 18 e 19 — células parasitadas alteradas com inclusões cristalóides (fig. 18) e globóide (fig. 19) no citoplasma. *Toddia* oval (fig. 19).

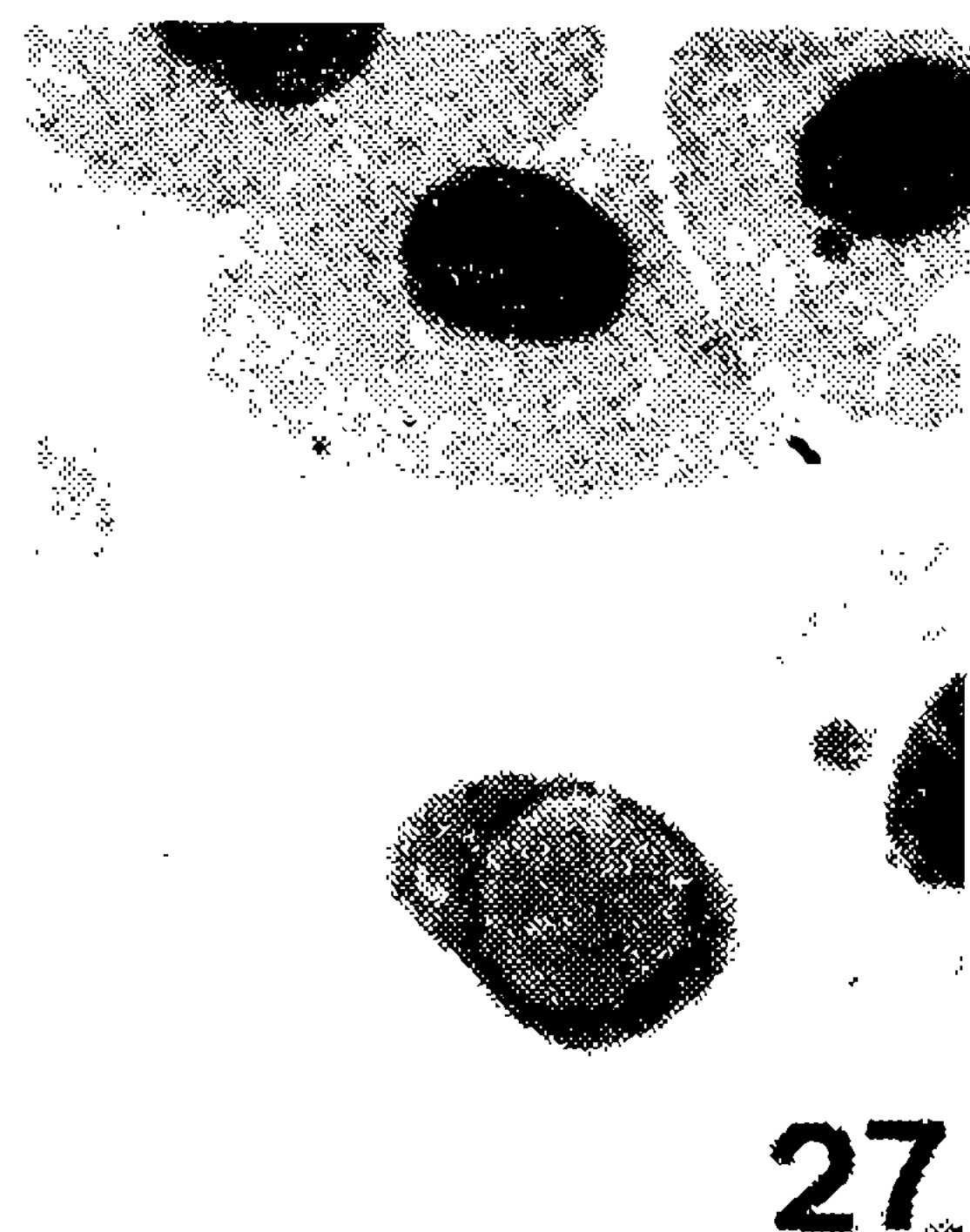
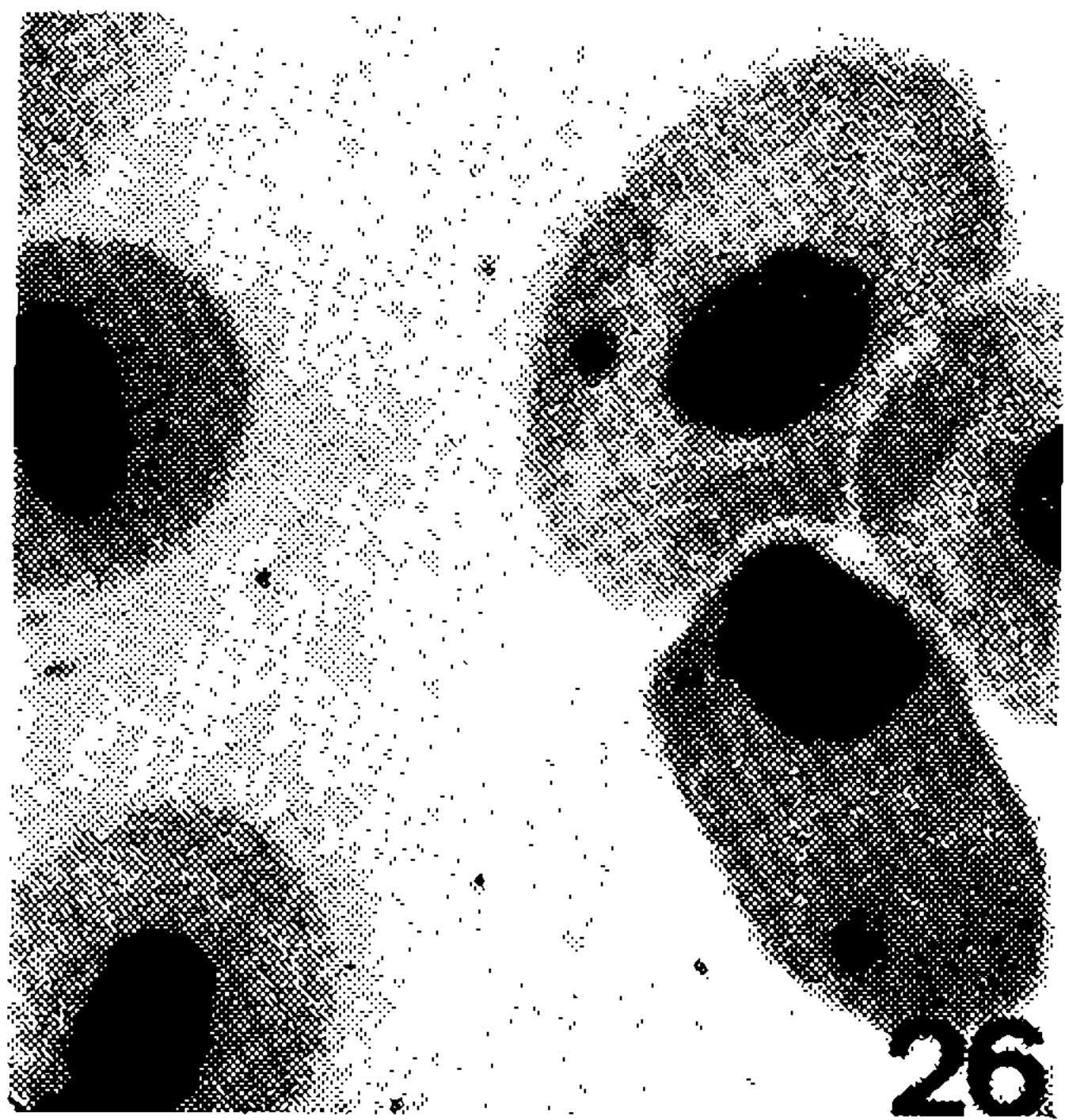
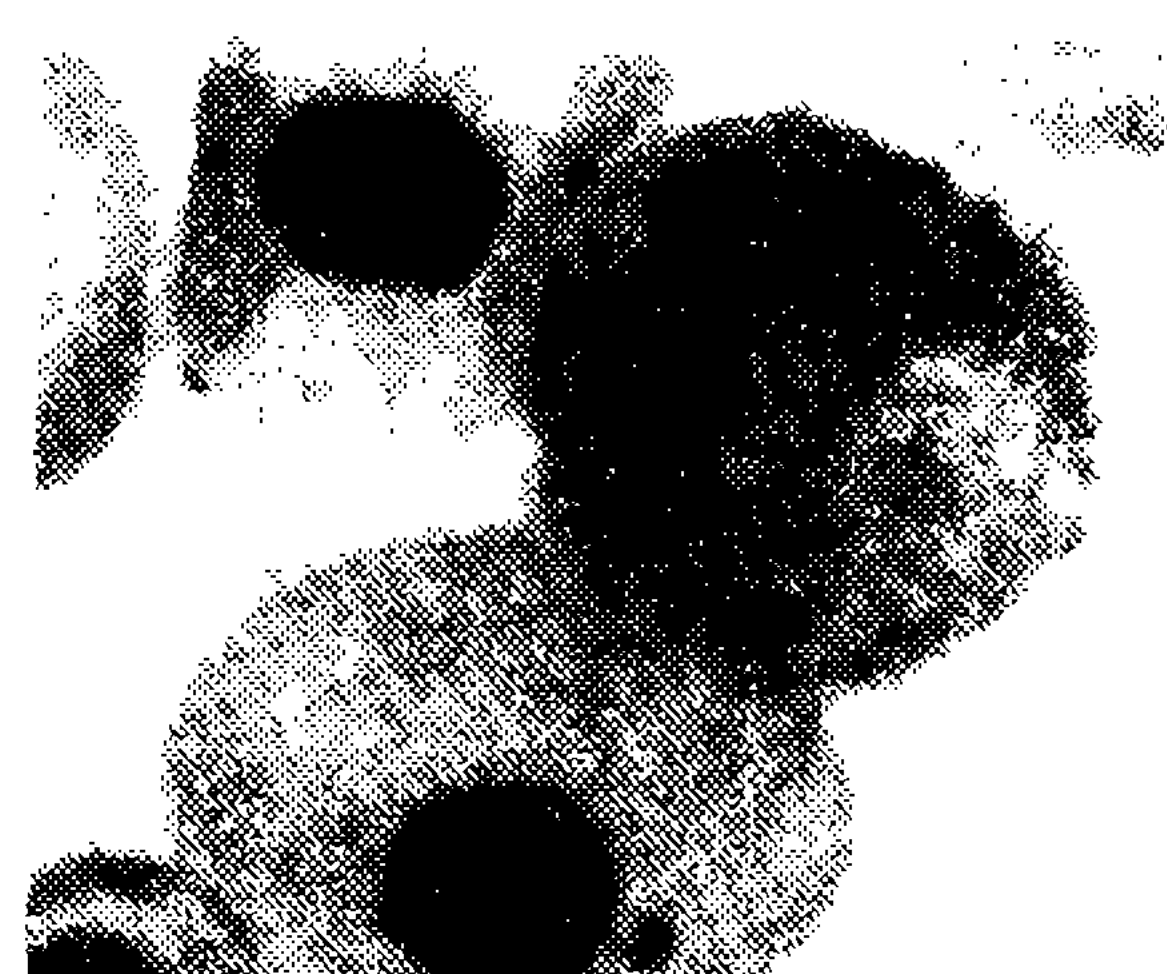
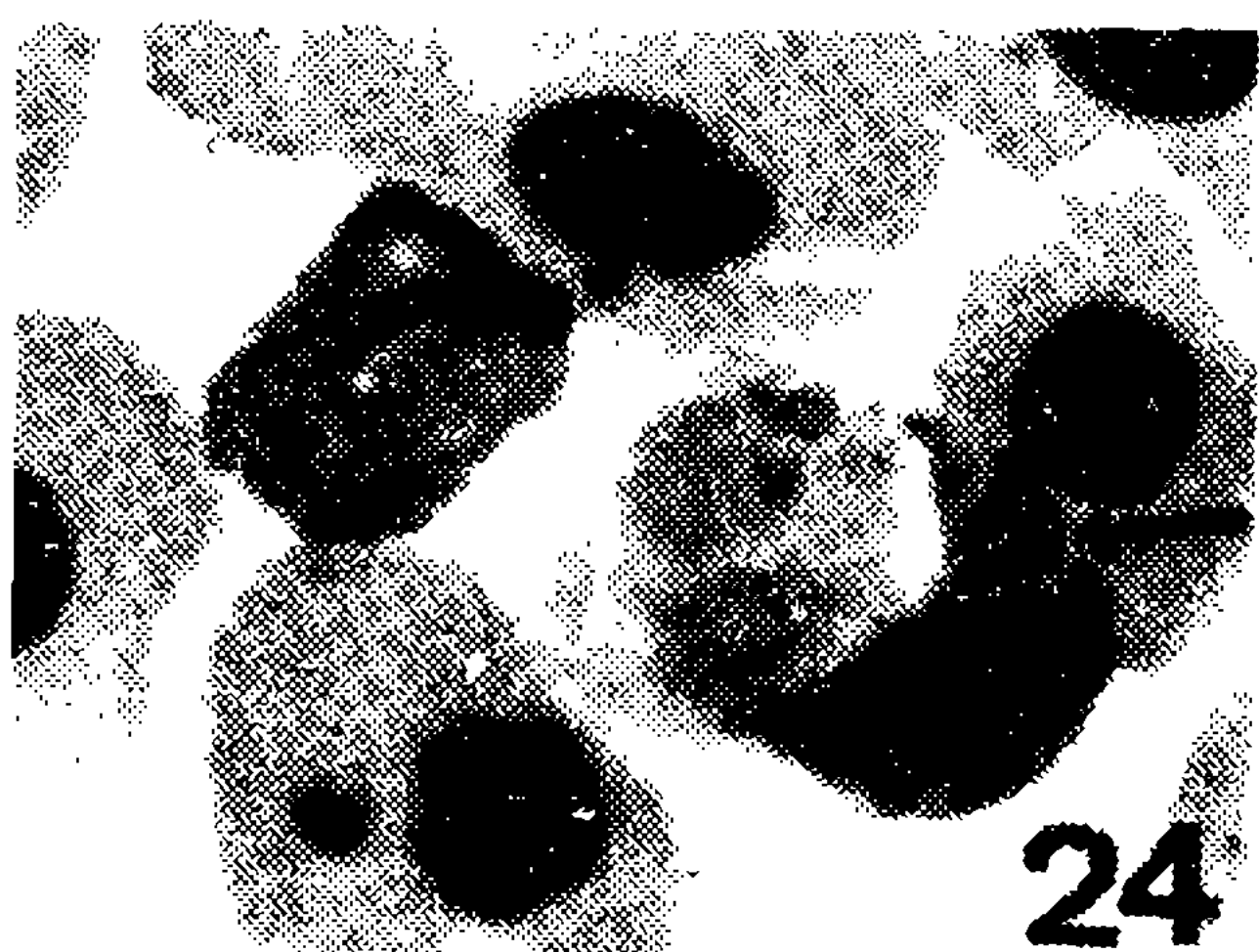
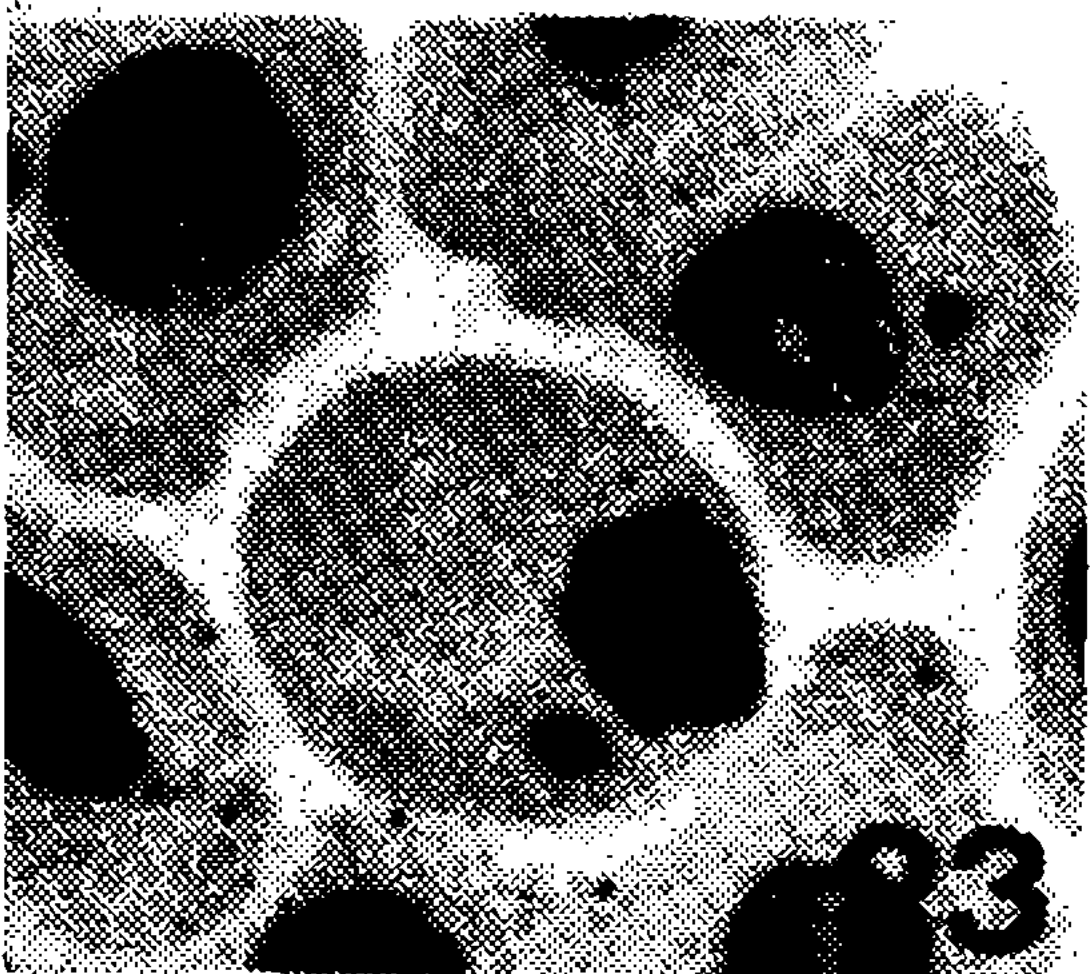
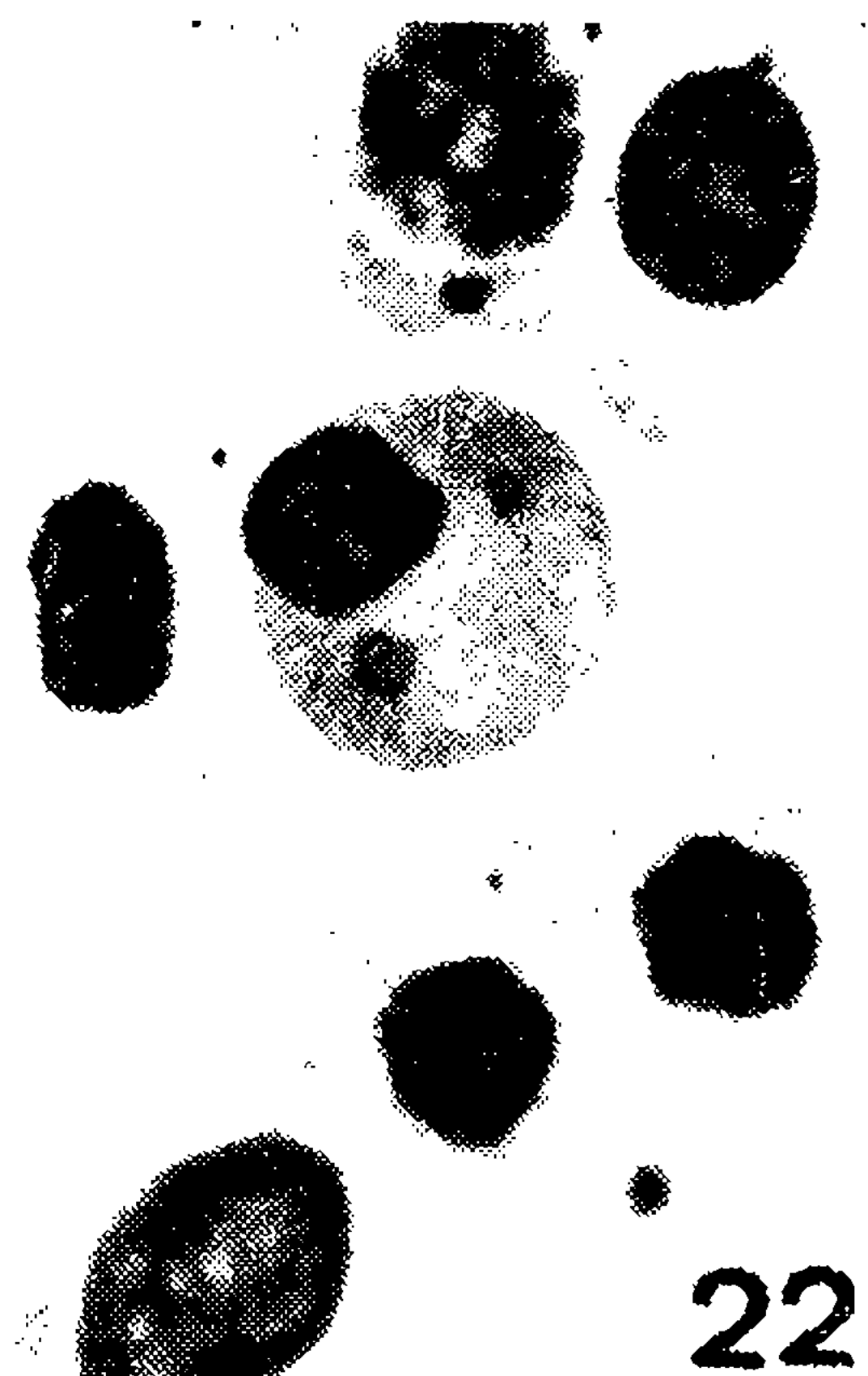
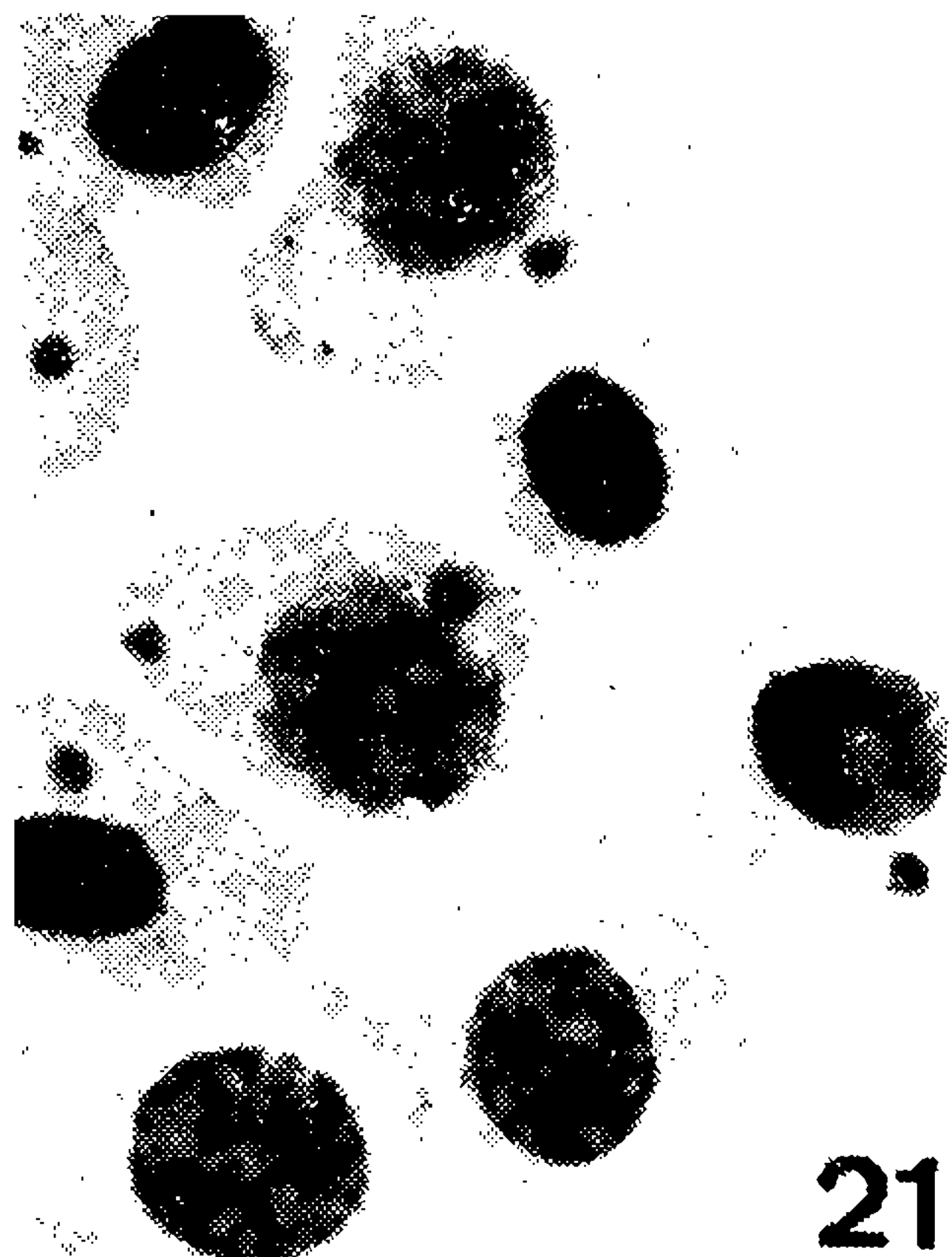
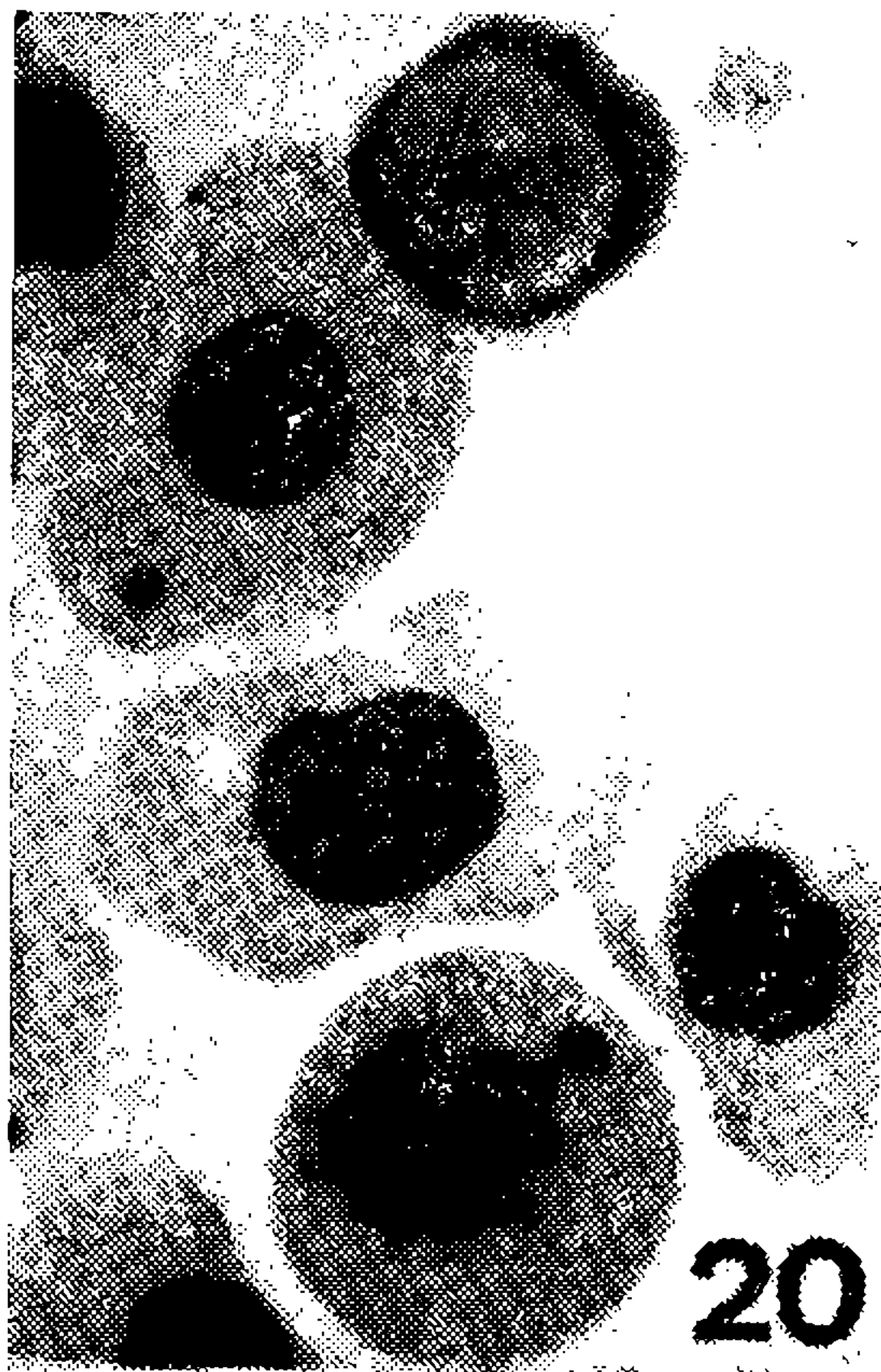


ESTAMPA III

Figs. 20 a 27: Infecção natural por *Toddia* em *Bufo marinus*, aumento 1000 x

Figs. 20 a 24 — (1.º dia de observação): aspecto geral das acentuadas alterações nucleares das células parasitadas, mostrando núcleos com cromatina dispersa ou em grumos; fig. 22 — glóbulo parasitado com duas todias e inclusão cristalóide citoplasmática deslocando o núcleo; fig. 23 — inclusão cristalóide em formação no núcleo de glóbulo vermelho e glóbulo parasitado com inclusão citoplasmática deslocando o núcleo; fig. 24 — *Toddia* em eosinófilo (seta), com inclusão cristalóide no citoplasma.

Figs. 25 a 27 — (15.º dia de observação): células em geral menos alteradas e diminuição da parasitemia. fig. 25 — *Toddia* em leucócito; fig. 27 — inclusão cristalóide em núcleo destruído.



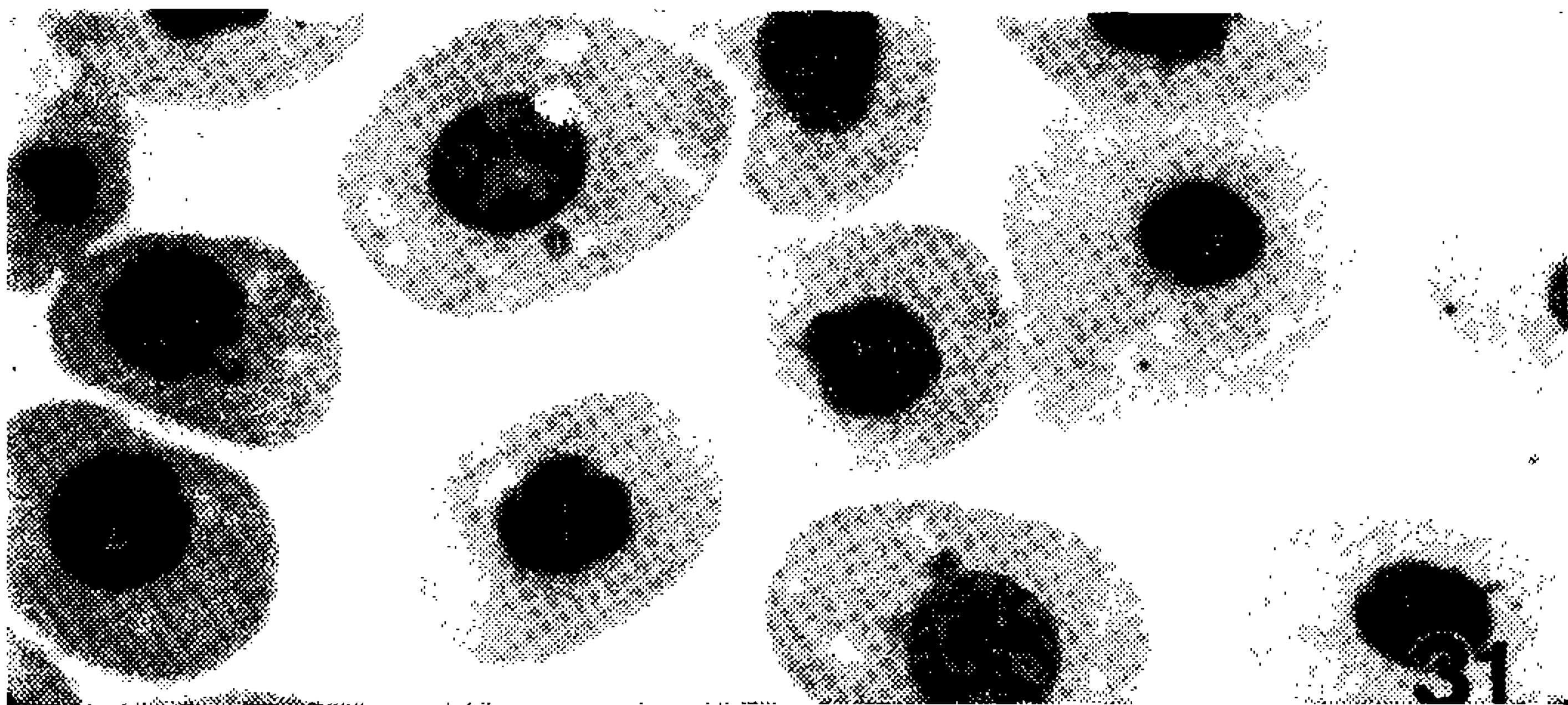
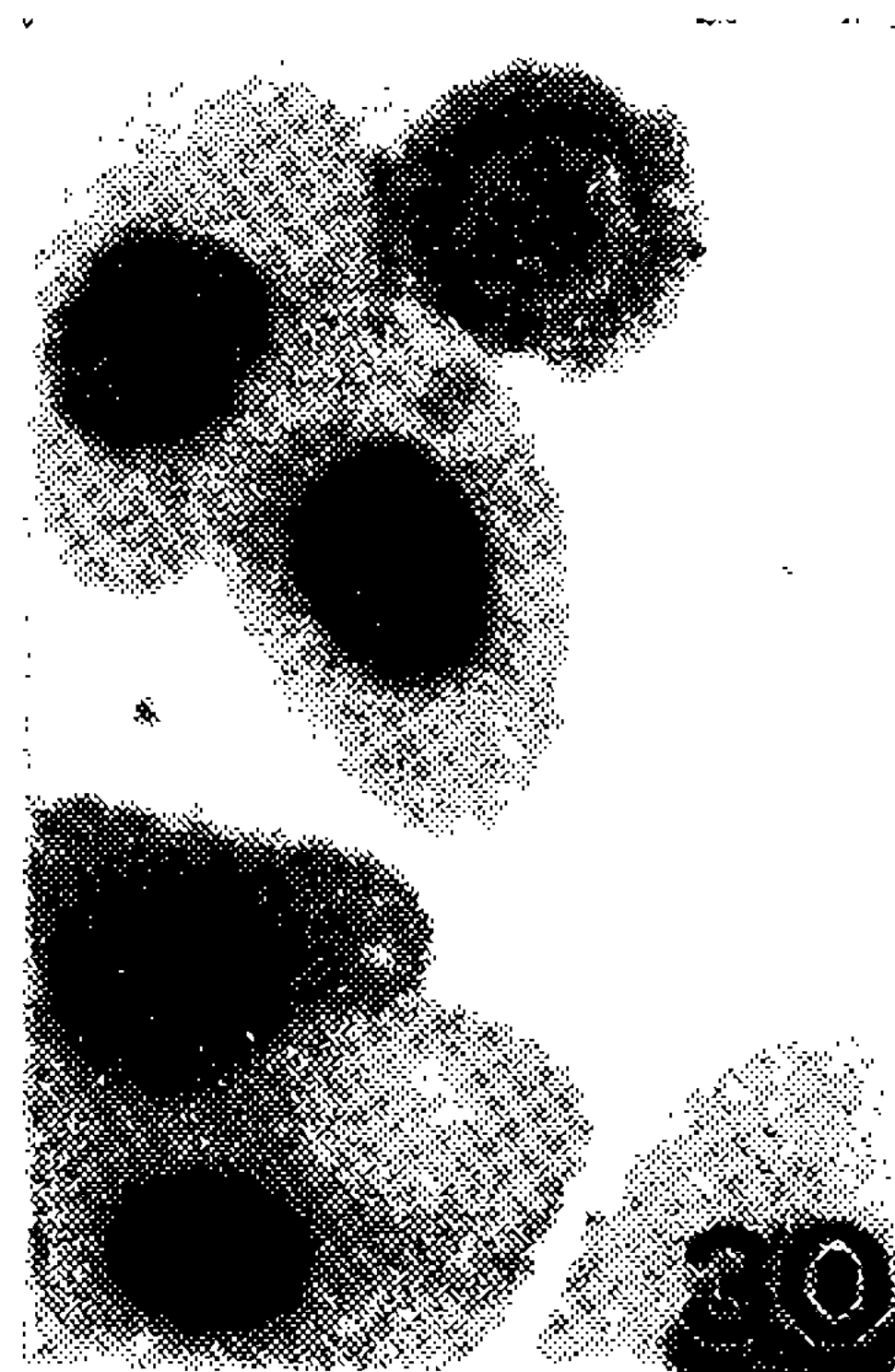
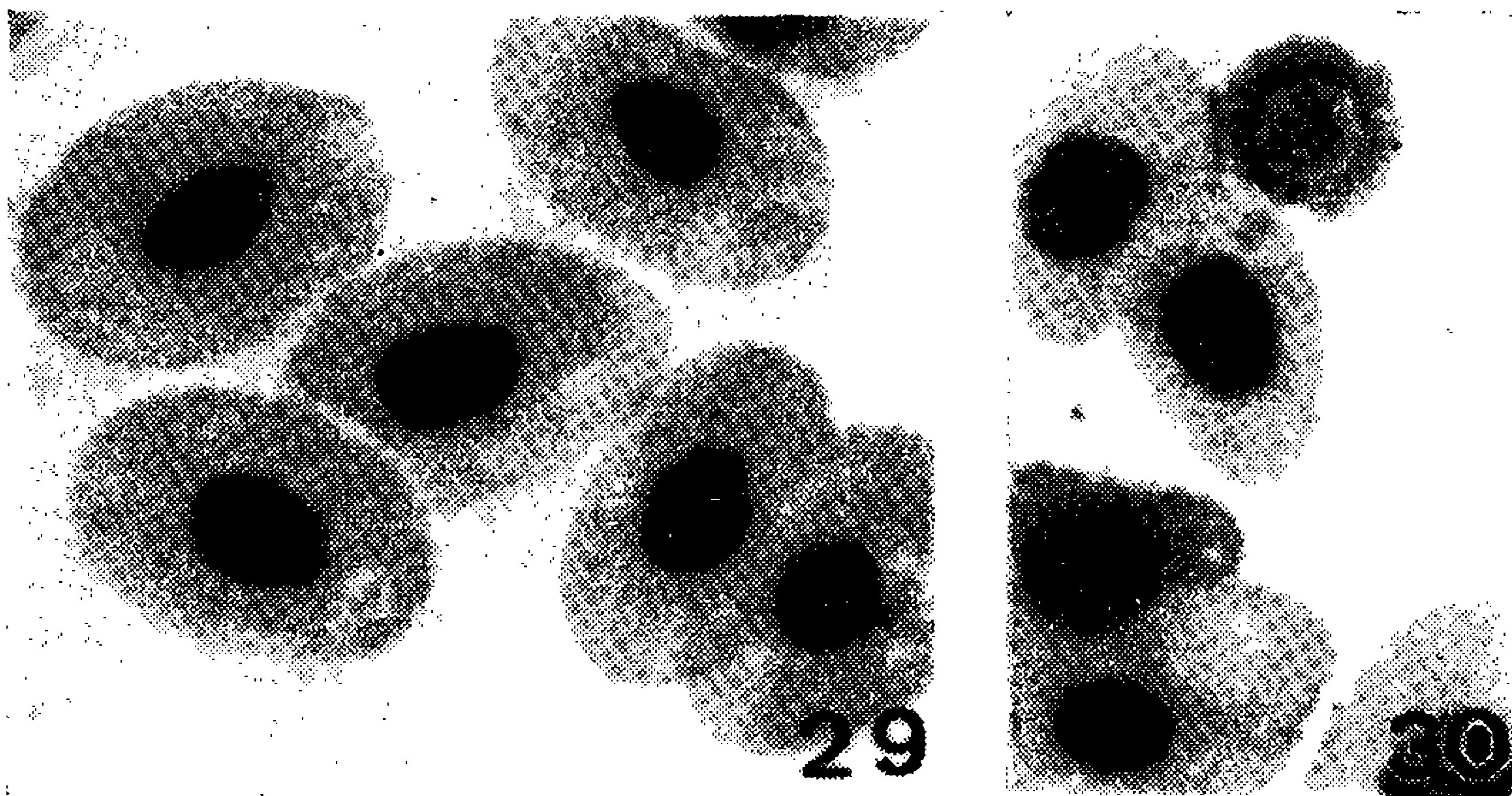
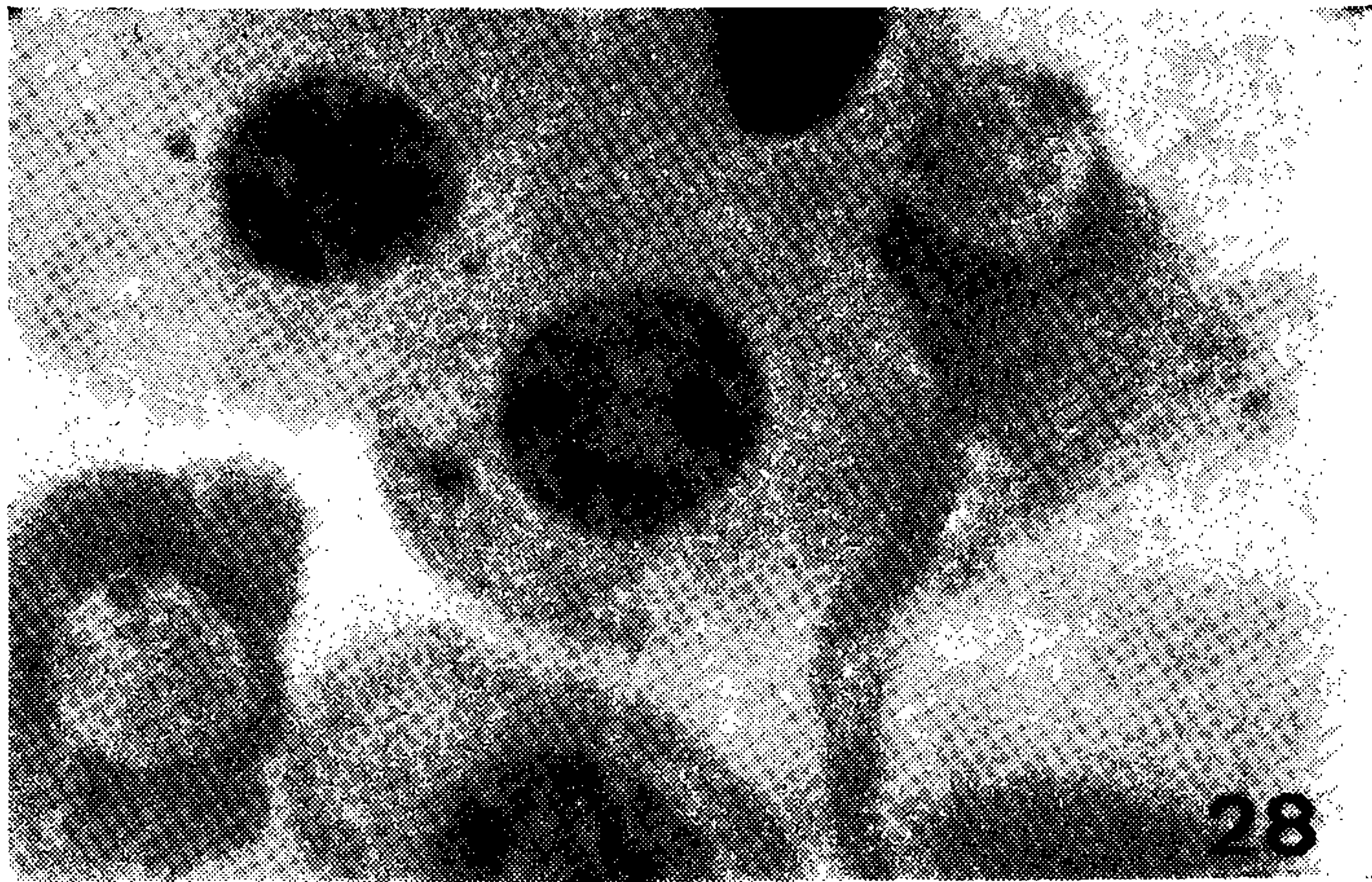
Pereira, Costa & Sousa: *Toddia* sp.

ESTAMPA IV

Figs. 28 a 31: Infecção natural por *Toddia* em *Bufo marinus*; aumento 1000 x (exceto fig. 28, 2000 x).

Fig. 28 — (15.º dia de observação): inclusões cristalóides (com 4 e 8 lados) em núcleos destruídos.

Fig. 29 — (25.º dia de observação) e figs. 30 e 31 (30.º dia de observação): parasitemia diminuída, muitas células com aspecto normal.



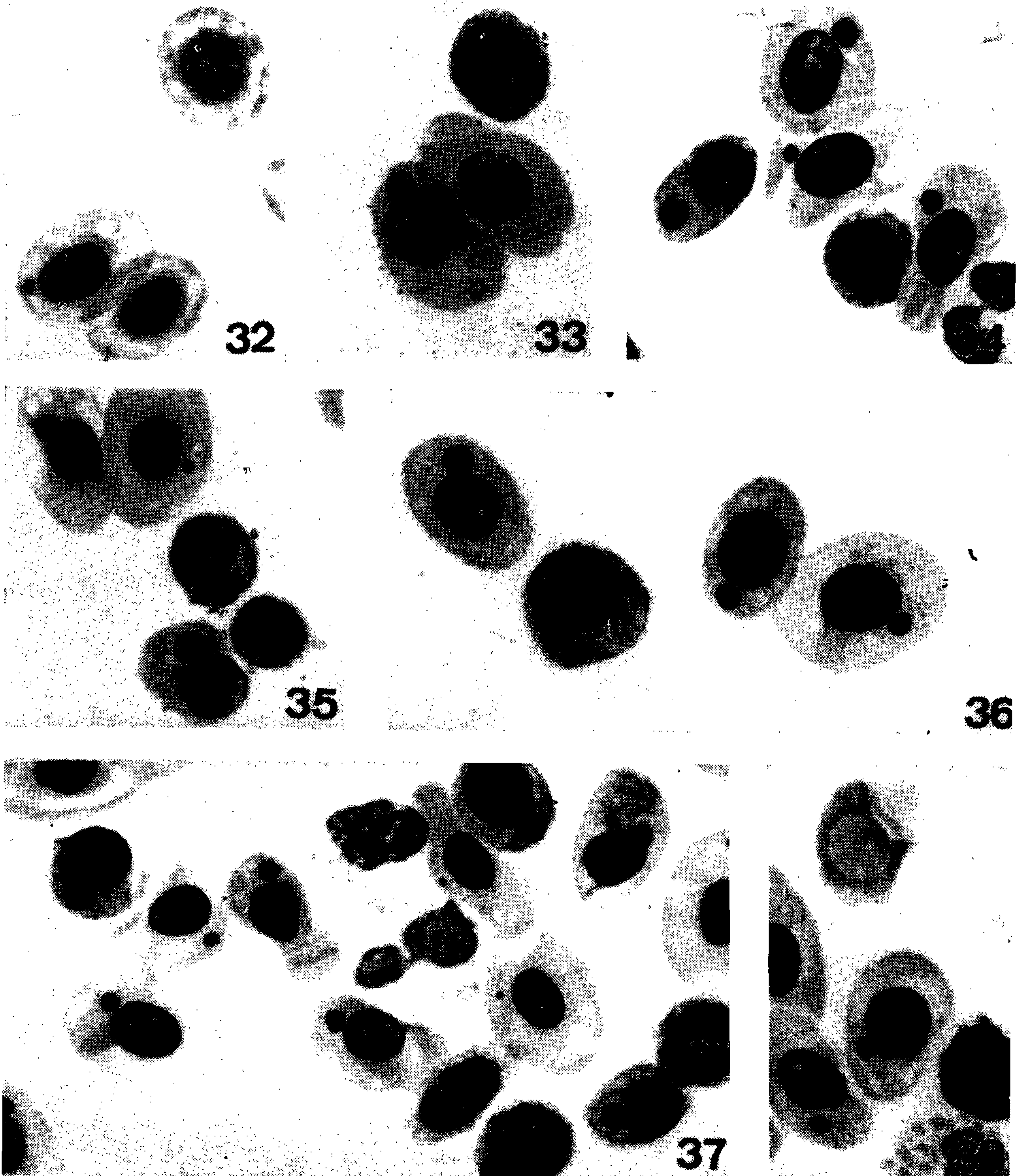
Pereira, Costa & Sousa: *Toddia* sp.

ESTAMPA V

Figs. 32 a 38: Infecção experimental em *Bufo marinus*; aumento 1000 x.

Fig. 32 — (4 dias após as inoculações): *Toddia* em célula ligeiramente alterada.

Figs. 33 a 38: (7 dias após as inoculações) Fig. 33 — glóbulo com duas *Toddias* e cristal citoplasmático; figs. 34 a 38 — glóbulos muito alterados, parasitas grandes, inclusões cristalóides no núcleo e no citoplasma; fig. 37 — aspecto geral do tecido sangüíneo parasitado com intensas alterações, *toddias* de diferentes tamanhos; glóbulos com citoplasma escurecido; fig. 38 — inclusão cristalóide em núcleo destruído.



Pereira, Costa & Sousa: *Toddia* sp.

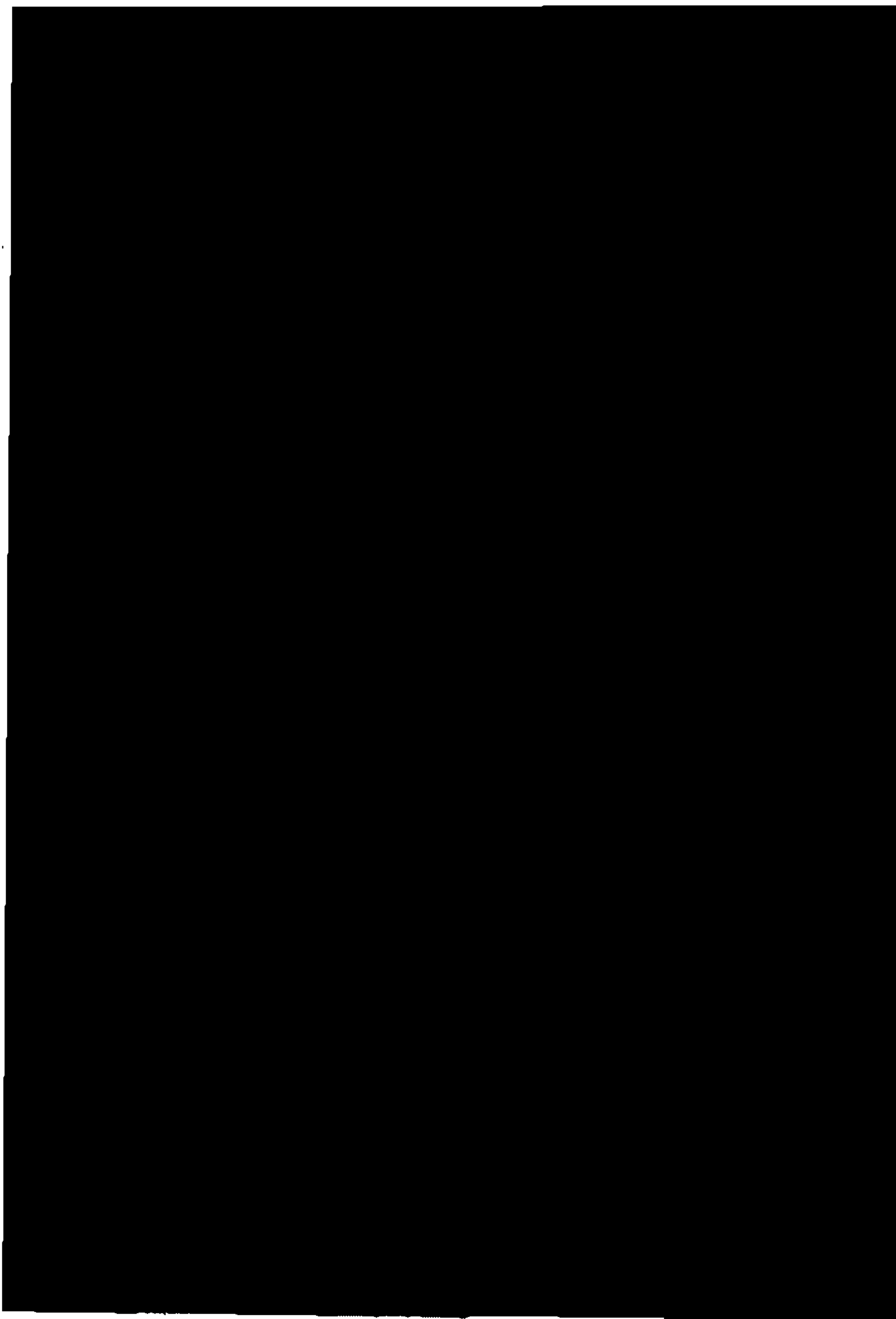


Fig. 39 — Microscopia de fluorescência (técnica de laranja de acridina) mostrando a fluorescência para o DNA em *Toddia* junto ao núcleo do eritrócito. Considerando-se o terceiro núcleo de baixo para cima, vêem-se 2 esferas diametralmente opostas que constituem o parasito com forte reação para o DNA. Comparar com a figura 15 da Estampa II que apresenta uma célula parasitada de forma semelhante. Observam-se também os núcleos da célula hospedeira muito alterados exceto uma na parte superior da Fotografia (*Toddia* de *Bufo marinus*).