

AGENCY FOR INTERNATIONAL DEVELOPMENT  
WASHINGTON, D. C. 20523  
**BIBLIOGRAPHIC INPUT SHEET**

FOR AID USE ONLY

1. SUBJECT CLASSIFICATION	A. PRIMARY Agriculture	AL72-0000-G518
	B. SECONDARY Pests of animals--Colombia	

2. TITLE AND SUBTITLE  
Ultraestructura de la Babesia begemina

3. AUTHOR(S)  
Gonzalez, E.F.; Todorovic, R.A.; Adams, L.G.

4. DOCUMENT DATE 1971	5. NUMBER OF PAGES 22p.	6. ARC NUMBER ARC
--------------------------	----------------------------	----------------------

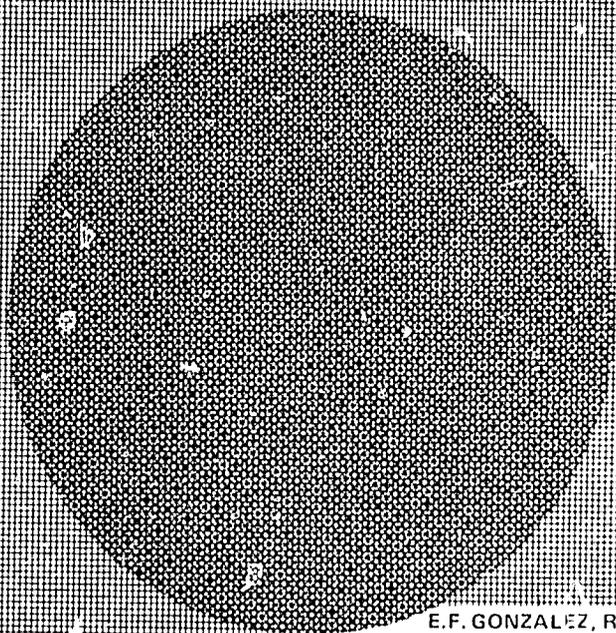
7. REFERENCE ORGANIZATION NAME AND ADDRESS  
Tex. A&M

8. SUPPLEMENTARY NOTES (*Sponsoring Organization, Publishers, Availability*)  
(In Revista ICA, v.6, no.1, p.89-110)

9. ABSTRACT

10. CONTROL NUMBER PN-RAA- 244	11. PRICE OF DOCUMENT
12. DESCRIPTORS Babesia Colombia Electron microscopy	13. PROJECT NUMBER
	14. CONTRACT NUMBER CSD-1947 Res.
	15. TYPE OF DOCUMENT

ICA  
INSTITUTO COLOMBIANO AGROPÉCUARIO



E.F. GONZALEZ, R.A. TODOROVIC Y L.G. ADAMS

# ULTRAESTRUCTURA DE LA BABESIA BIGEMINA

VOLUMEN VI

SEPARATA DE LA REVISTA ICA  
NUMERO 1

MARZO DE 1971

# ULTRAESTRUCTURA DE LA BABESIA BIGEMINA. \*

E. F. GONZALEZ,  
R. A. TODOROVIC. y  
L. G. ADAMS\*\*

## 1. INTRODUCCION

La babesiosis bovina es una enfermedad infecciosa y transmisible causada por protozoarios intraeritrocíticos que pertenecen al género *Babesia* (36) y caracterizada por anemia progresiva y hemoglobinuria. Su relación con otros protozoarios hemáticos varía de acuerdo con los taxonomistas, sin embargo la babesiosis ha sido reconocida como una infección específica y grave en muchas áreas del mundo y predomina especialmente en países tropicales en donde existen garrapatas (35). En países como los Estados Unidos se ha logrado su erradicación con un programa de eliminación del vector (*Boophilus annulatus*).

La babesiosis tiene gran importancia en Colombia por las pérdidas económicas que de ella se derivan. De acuerdo con la literatura, la enfermedad existe como una infección mixta de *Babesia bigemina*, *Babesia argentina* y *Babesia major* (35).

---

\* Contribución del Programa Nacional de Patología y Parasitología, Instituto Colombiano Agropecuario. ICA.

\*\* Respectivamente: Patólogo Asistente, D.V.M. Programa de Patología, Instituto Colombiano Agropecuario. Apartado Aéreo 233, Palmira, Colombia. Profesor Asociado, D.V.M., M.S., Ph.D. Texas A&M University, Fundación Rockefeller. Apartado Aéreo 5813, Bogotá, Colombia. Profesor Asistente, D.V.M., Ph.D. Texas A&M University, Fundación Rockefeller. Apartado Aéreo 5813, Bogotá, Colombia.

---

Los autores expresan su agradecimiento a la Fundación Rockefeller y al Departamento de Microscopia Electrónica de la Universidad del Valle, por la colaboración prestada para la realización de este trabajo.

La estructura de la *B. bigemina*, *B. argentina* y *B. major* no ha sido adecuadamente determinada. Varias observaciones realizadas en microscopio de luz han revelado que el organismo toma muchas formas, apareciendo generalmente en forma de estructuras piriformes unidas en ángulo agudo por sus extremos afilados, aunque también pueden asumir formas esféricas. En frotis de sangre teñidos por la coloración Giemsa o Wright, su componente citoplásmico se tiñe de azul y el núcleo toma una coloración rojiza.

*B. bigemina* es un parásito grande de 4–5 micras de largo por 2–3 micras de diámetro. *B. argentina* es pequeña de 2–1,5 y suele tener forma redonda. *B. major* es parecida a la *B. bigemina* aunque es menor, midiendo de 2,6 a 1,5 micras. Con el empleo del microscopio electrónico muchas de las diferencias de estas especies pueden ser mejor conocidas.

La reproducción, el mecanismo de alimentación y otros factores de relación entre huésped y el parásito no están claramente dilucidados: sin embargo, existen estudios recientes hechos en *Babesia canis* (3), *Babesia rodhaini* (28), *B. canis* (31) y *Babesia caballi* (23), sin que hayan aportado mayor información al respecto. No se encontraron en la literatura estudios en microscopio electrónico en *B. bigemina*, *B. argentina* y *B. major*.

Trabajos realizados en microscopio electrónico con varias especies de parásitos maláricos, describen que estos organismos intracelulares se alimentan de sus huéspedes por fagocitosis o pinocitosis, tomando partes del citoplasma del eritrocito y almacenándolas en vacuolas de alimentación o sostenimiento (24), (25), (26). Para determinar si otros parásitos intracelulares en especial los del género *Babesia* en bovinos se alimentan en la misma forma, se hizo el estudio en microscopio electrónico.

Aunque el mecanismo exacto de alimentación del parásito no está muy claro y ha dado lugar a controversias, Hepler y col. (14) no están de acuerdo con la explicación de Rudzinska y Trager (25). Sin embargo, varios trabajos de la ultraestructura de parásitos maláricos (1, 6, 8, 11, 16, 17, 31, 32) han confirmado el mecanismo antes reportado por Rudzinska y Trager (24).

En algunos casos dice Rudzinska, (26) que moléculas más grandes pueden pasar a través de la membrana celular del parásito. En los parásitos maláricos por ejemplo parece que la hemoglobina penetra en forma intacta a través de la membrana citoplásmica del parásito y forma la hemozoína, la cual es un residuo insoluble de la digestión de la hemoglobina.

El microscopio electrónico ha revelado sin embargo que en dos especies de parásitos maláricos *Plasmodium lophurae* (24) y *Plasmodium berghei* (25), la hemoglobina penetra en el parásito no a través de la membrana citoplásmica sino por un proceso de invaginación hasta formar vacuolas pinocíticas de alimentación. La digestión de estas vacuolas puede realizarse en dos formas (24): en *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium lophurae*; la digestión se hace sin vacuolas de hemozoína y en *Plasmodium*

*vivax*, *Plasmodium ovale* y *Plasmodium gonderi*. pequeñas vesículas son expulsadas de las vacuolas de alimentación y la digestión se hace en estas vesículas (26).

## 2. MATERIALES Y METODOS

La cepa de *B. bigemina* fue obtenida de animales infectados naturalmente en una región del Valle del Cauca y fue purificada en terneros esplenectomizados hasta cuando la parasitemia fue alta (25o/o). La sangre fue recolectada con anticoagulante (EDTA) a concentración de 1,2 por litro y preservada bajo refrigeración durante cuatro horas.

La sangre en estas condiciones fue fijada con solución Buffer (pH 7.2; 0,1 molar) de glutaraldehído centrifugando durante 10 minutos por tres veces con una hora de intervalo a 1.000 r.p.m. y 0oC. Luego se lavó con una solución buffer-fosfato sucrosa (pH 7.2; 0,1 molar) centrifugando por cinco minutos y cuatro veces durante una hora. Después se colocó en una solución de agar al 2o/o en agua destilada durante 30 minutos y 0oC para pelletizarla. Se hicieron secciones de un mm de espesor y el material se fijó con osmio-buffer fosfato (pH 7,2; 0,1 molar) durante cinco horas y se lavó con una solución buffer-fosfato sucrosa (pH 7.2; 0,1 molar).

El proceso de deshidratación se hizo con alcohol etílico al 50o/o durante 15 minutos; se pasó a alcohol etílico de 75o/o por otros 15 minutos y finalmente a alcohol etílico de 95o/o por otros 15 minutos. Luego se hicieron tres cambios de 15 minutos cada uno en alcohol etílico y otros tres cambios de 15 minutos cada uno en solución de óxido-propileno, dejando el material en esta solución y maraglass a partes iguales durante dos horas y maraglass solamente durante 12 horas.

La inclusión se hizo en maraglass a una temperatura de 60oC durante 48 horas. El material incluido fue cortado con un ultramicrotomo PORTER BLUM MT2 a 500 amstros, utilizando cuchillas de diamante.

La coloración se hizo con acetato de uranillo al 2o/o durante 15 minutos, lavando con agua bidestilada y colorante de Millonig (solución de tartrato) durante 30 minutos y lavados en agua bidestilada. El espécimen se colocó en rejillas de 100 huecos protegido por una película fomvar y película de carbón.

Las fotografías se tomaron en un microscopio JEOL, tipo JEM-7A.

## 3. RESULTADOS

### 3.1. MORFOLOGIA

Utilizando bajos aumentos en microscopio electrónico, es posible

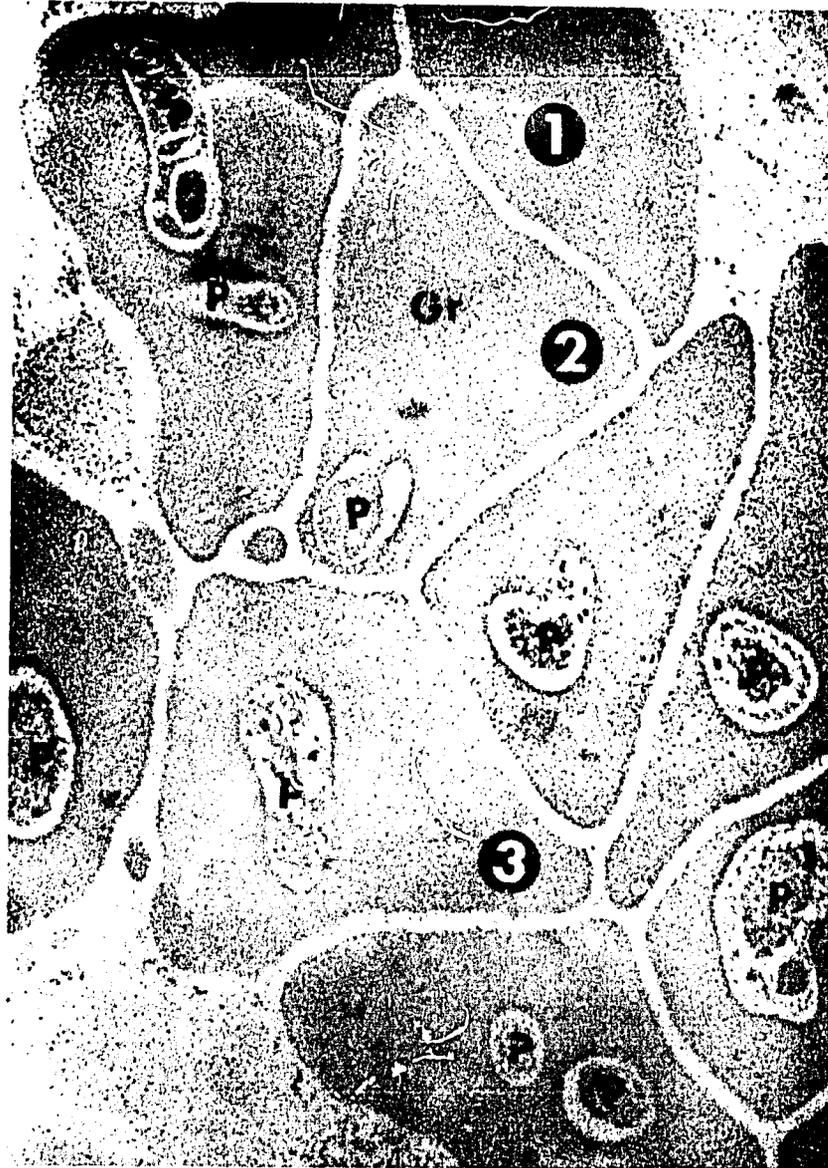
observar cómo los parásitos pueden tomar diferentes formas y tamaños. En las microfotografías se observa la forma de pera como la más común en las extensiones de sangre vistas en microscopio de luz, pero no es esta la única, ya que se pueden apreciar formas redondeadas, otras que sugieren formas cónicas o formas de hojas y otras más pequeñas generalmente ovaladas o redondeadas que corresponden a formas evolutivas del parásito (Figuras 1 y 2). Sabiendo que el tamaño de un glóbulo rojo de un bovino suele tener de seis a siete micras de diámetro, los tamaños de la *B. bigemina* varían generalmente en las formas alargadas llegando a tener cuatro micras de largo por dos a tres micras de ancho y en algunos casos alcanzan hasta seis micras de largo (Figura 3). Para las formas redondeadas el tamaño alcanza de 3-4 micras de diámetro en los parásitos adultos y de 1 a 2 micras en las formas evolutivas. La localización del parásito es generalmente central.

La *B. bigemina* muestra poseer una membrana citoplásmica densa, no muy definida pero que revela ser simple. Entre ésta y el retículo endoplásmico se ve un espacio claro de unos 2.500 amstrongs o más. El retículo endoplásmico tiene un aspecto vesicular y está compuesto de gránulos que se unen formando una trama entre la membrana citoplásmica y la nuclear. Estos gránulos son de diferente tamaño observándose con mayor densidad que los componentes del huésped. La mayor condensación del retículo endoplásmico se suele observar alrededor del núcleo casi siempre hacia uno de sus lados (Figuras 4 y 5).

Generalmente el retículo endoplásmico se ve como una masa homogénea que suele alcanzar varias micras de largo por 0,5 micras de espesor dejando espacios claros alrededor del núcleo y de la membrana citoplásmica. En el citoplasma es también posible observar vacuolas aunque se han encontrado en poco número, apareciendo como formaciones claras, esféricas u ovoides y de morfología irregular (Figura 6).

Otras estructuras del citoplasma de la *Babesia* indican la presencia de cuerpos polares, llamados así por estar situados hacia la porción conoide o aguda del parásito. Son organelas de 0,3 a 0,5 micras de diámetro de forma ovalada que se hallan generalmente en número de 2 a 3 y que se diferencian del resto de los componentes del citoplasma por su mayor densidad. Se comunican a la porción cono del parásito por medio de estructuras de la misma densidad, las cuales corresponden a canales que al final se dividen en otros menores (Figuras 6, 7 y 8).

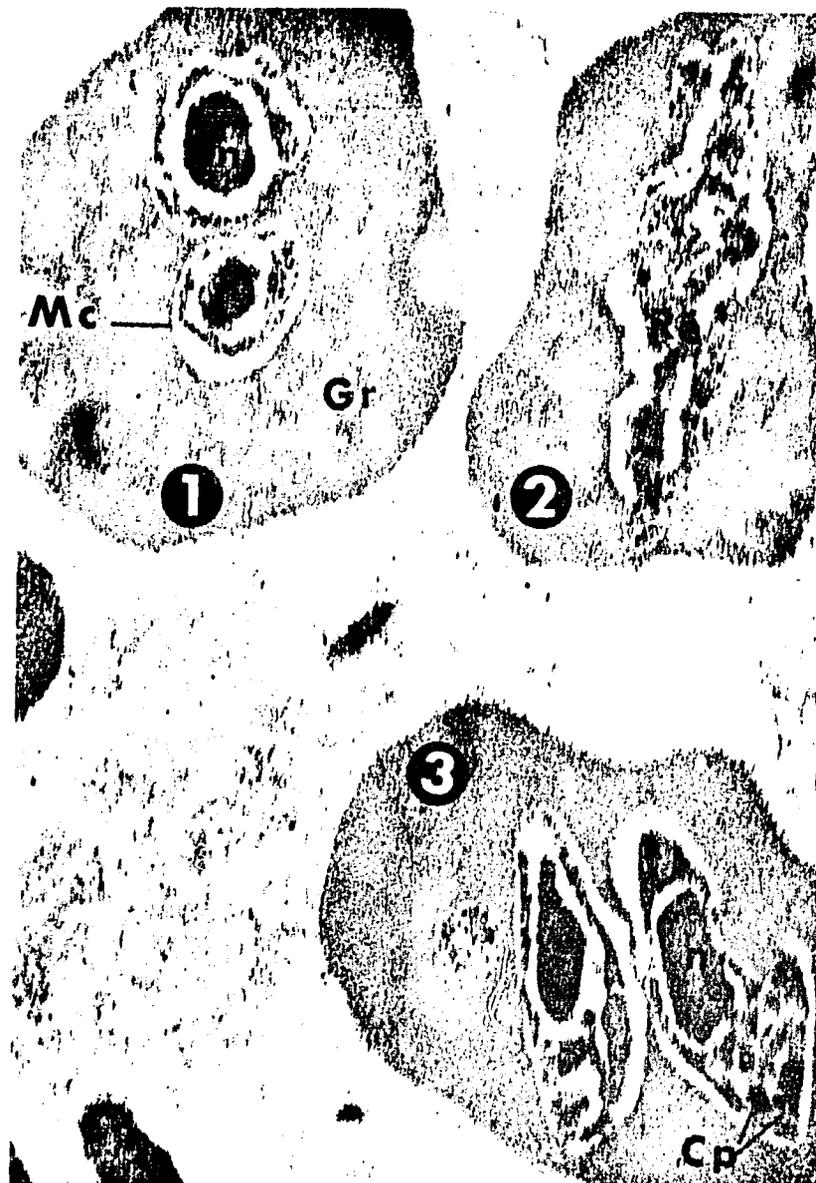
El núcleo aparece como una estructura grande que ocupa un tercio a un cuarto del volumen del parásito. Tiene forma redondeada u oval, a veces irregular y está colocado generalmente en el centro del parásito aunque puede verse cerca de su periferia. Posée una membrana nuclear simple pero densa, de un espesor de 800 a 1.000 amstrongs y puede alcanzar de 1,5 a 2,0 micras de diámetro. Su densidad es similar a la del huésped (Figuras 5, 6, 7 y 8).



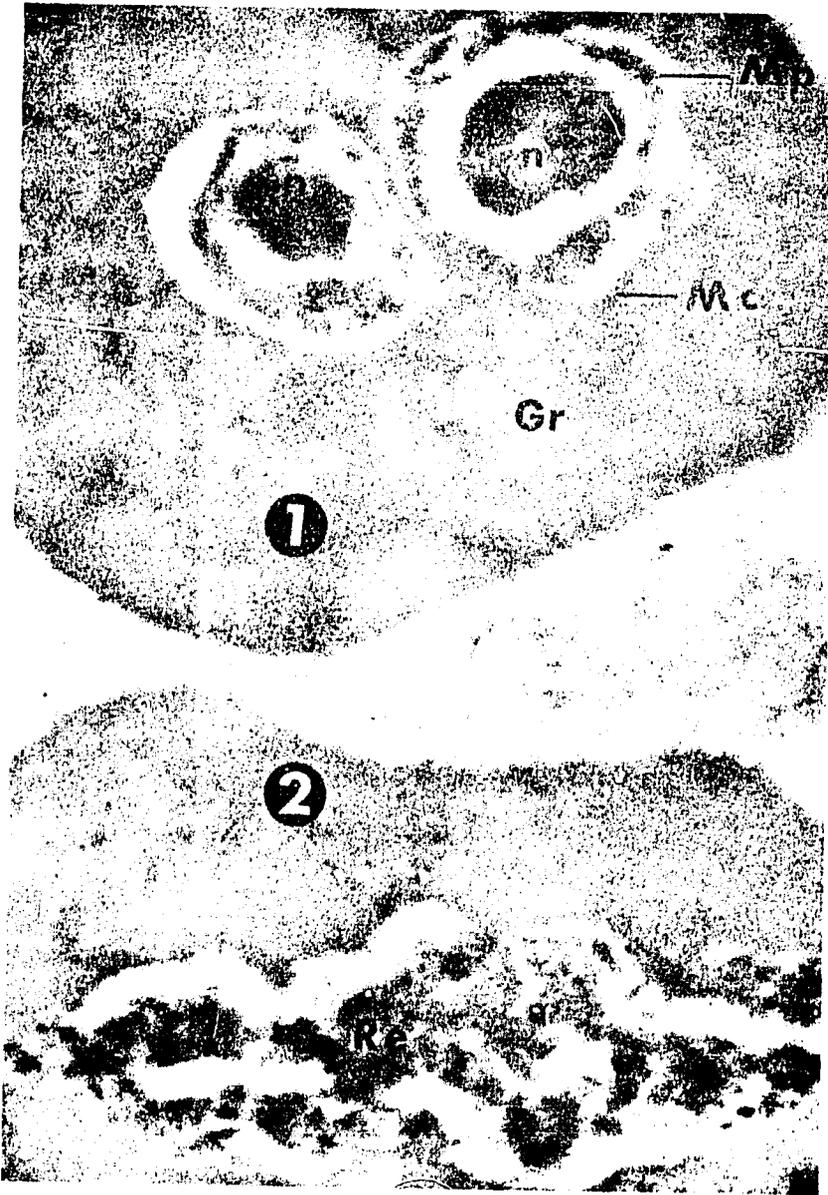
**FIGURA 1.** Microfotografía que muestra alta parasitemia con *Babesia bigemina*. Se ve un glóbulo rojo no infectado (1) y otros glóbulos rojos (Gr) infectados con parásitos (2, 3) Se aprecian formas del parásito (P) adultos y formas evolutivas. 11.800X.



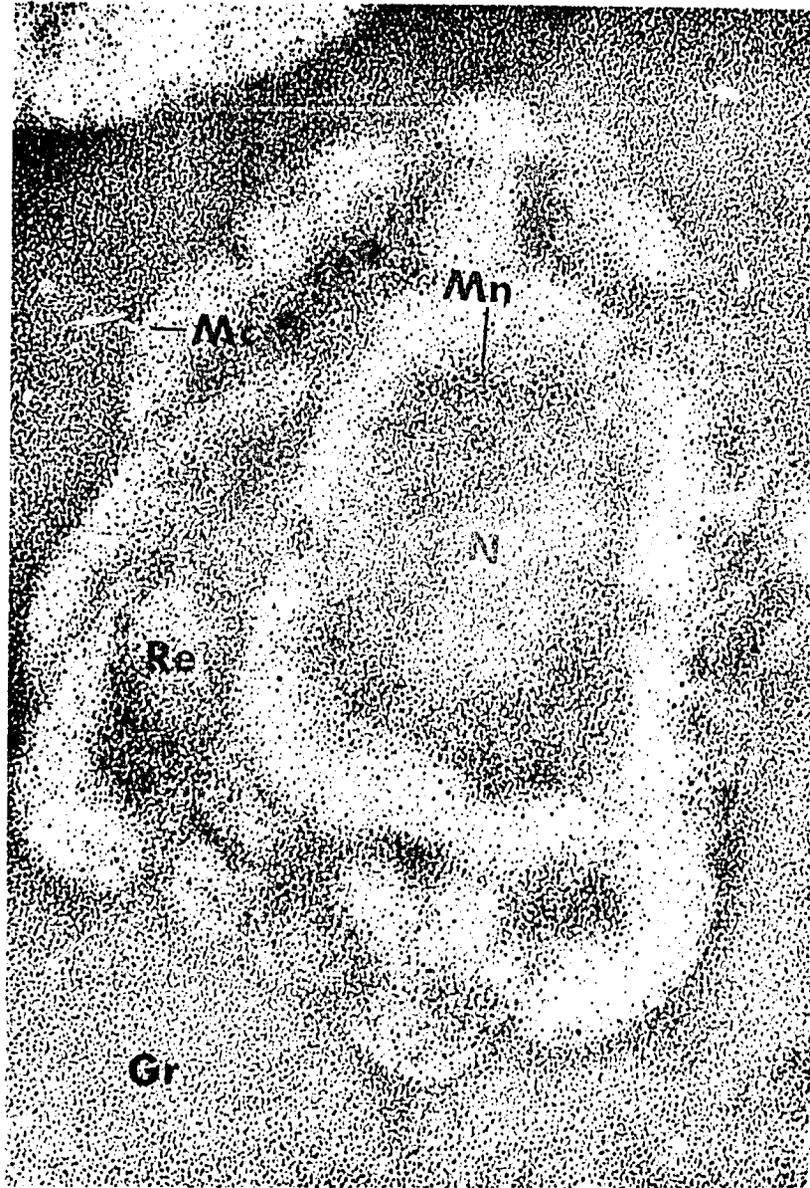
**FIGURA 2.** Microfotografía que muestra alta parasitemia con *Babesia bigemina*. El glóbulo rojo (1) contiene formas desarrolladas del parásito (P). Los otros glóbulos rojos muestran formas de pera, cónicas y redondeadas del parásito adulto con núcleos bien diferenciados (n). Se puede ver un glóbulo rojo (2) no infectado (Gr). 24.900X.



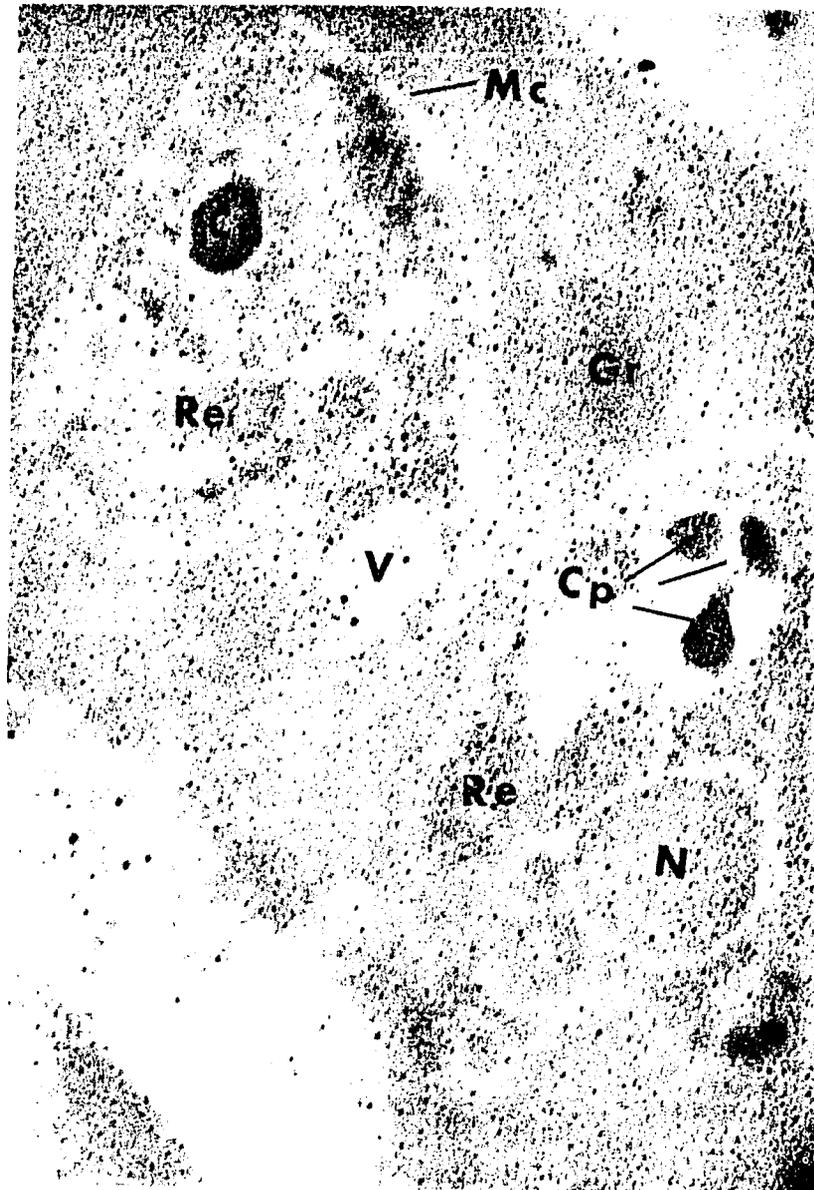
**FIGURA 3.** Tres glóbulos rojos parasitados. Corte transversal (1) y longitudinal del parásito (2, 3) Se pueden observar los núcleos (n), el retículo endoplásmico (Re), los cuerpos polares (Cp) y la membrana citoplásmica (Mc) del glóbulo rojo (Gr). 32.000X.



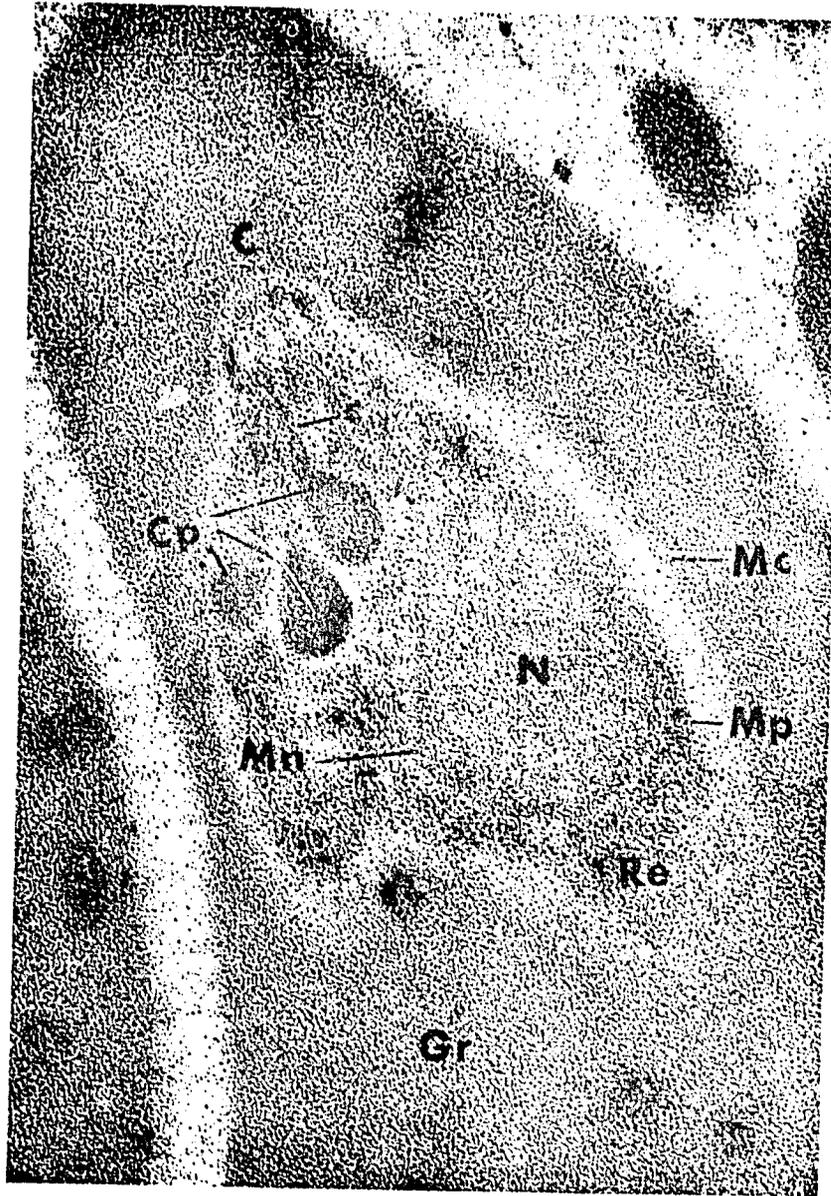
**FIGURA 4.** En el glóbulo rojo (Gr 1) se observa la membrana citoplásmica del mismo (Mc), la membrana parasítica (Mp) y los núcleos bien definidos (n) de los parásitos. El glóbulo rojo (2) contiene un parásito con retículo endoplásmico (Re) bien definido. 74.000X.



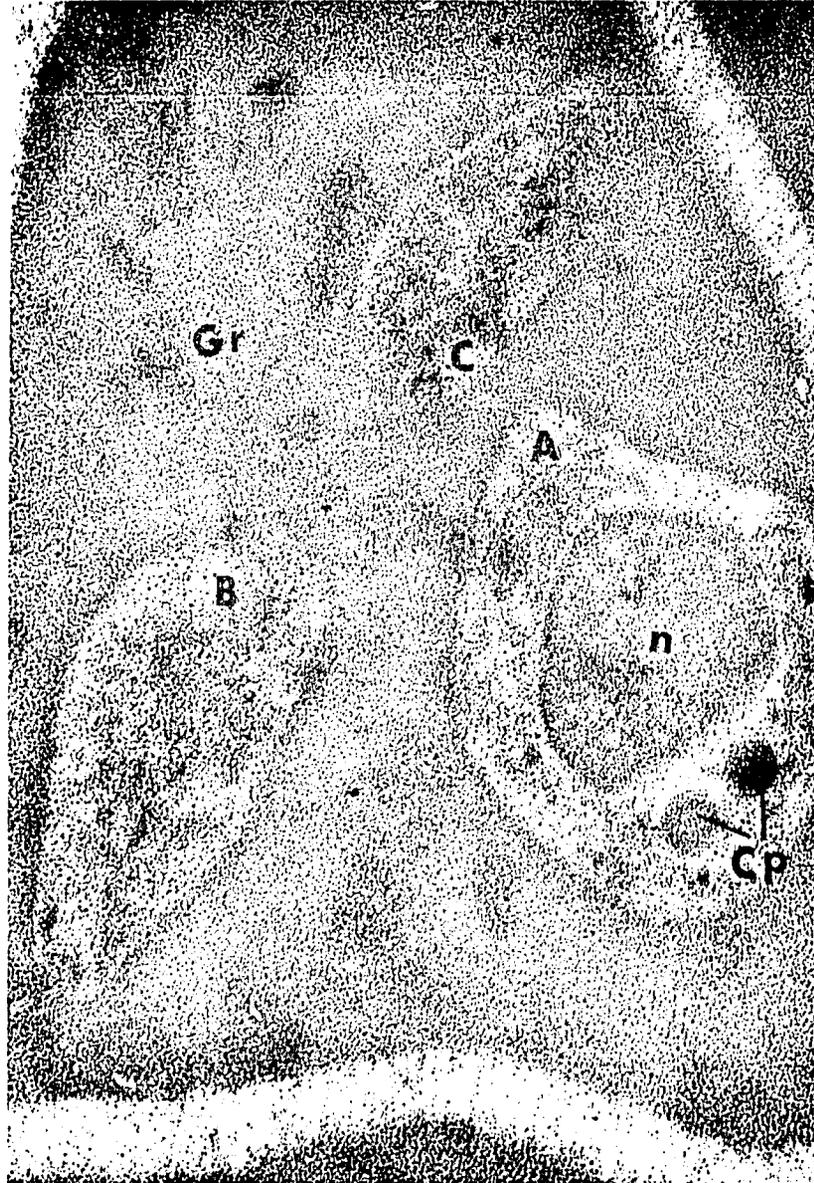
**FIGURA 5.** Corte transversal del parásito adulto en el cual se observa el núcleo (n), membrana nuclear (Mn), retículo endoplásmico (Re) y la membrana citoplásmica (Mc) del glóbulo rojo (Gr). 106.900X.



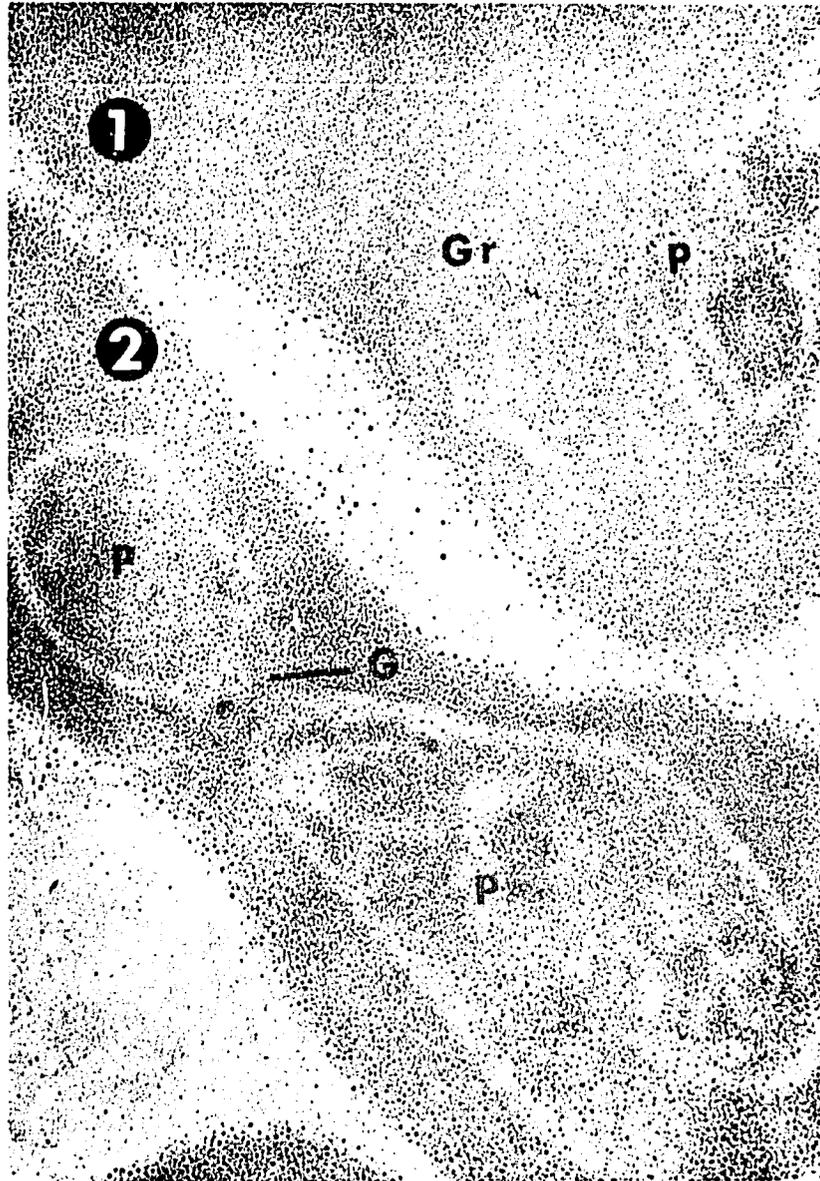
**FIGURA 6.** Microfotografía con dos formas desarrolladas de *Babesia bigemina*, en el glóbulo rojo (Gr). Se pueden apreciar los núcleos (n), cuerpos polares (Cp), retículo endoplásmico (Re), vacuola (V) y la membrana citoplásmica del glóbulo rojo (Mc). 75.000X.



**FIGURA 7.** Microfotografía de una *Babesia bigemina* que muestra la forma típica de pera; membrana citoplásmica (Mc) densa del glóbulo rojo (Gr). Las siguientes estructuras del parásito se pueden observar en esta microfotografía: membrana parasítica (Mp), núcleo (n), membrana nuclear (Mn), cuerpos polares (Cp) con canales (c) y la parte conoide del parásito (C). 88.100X.



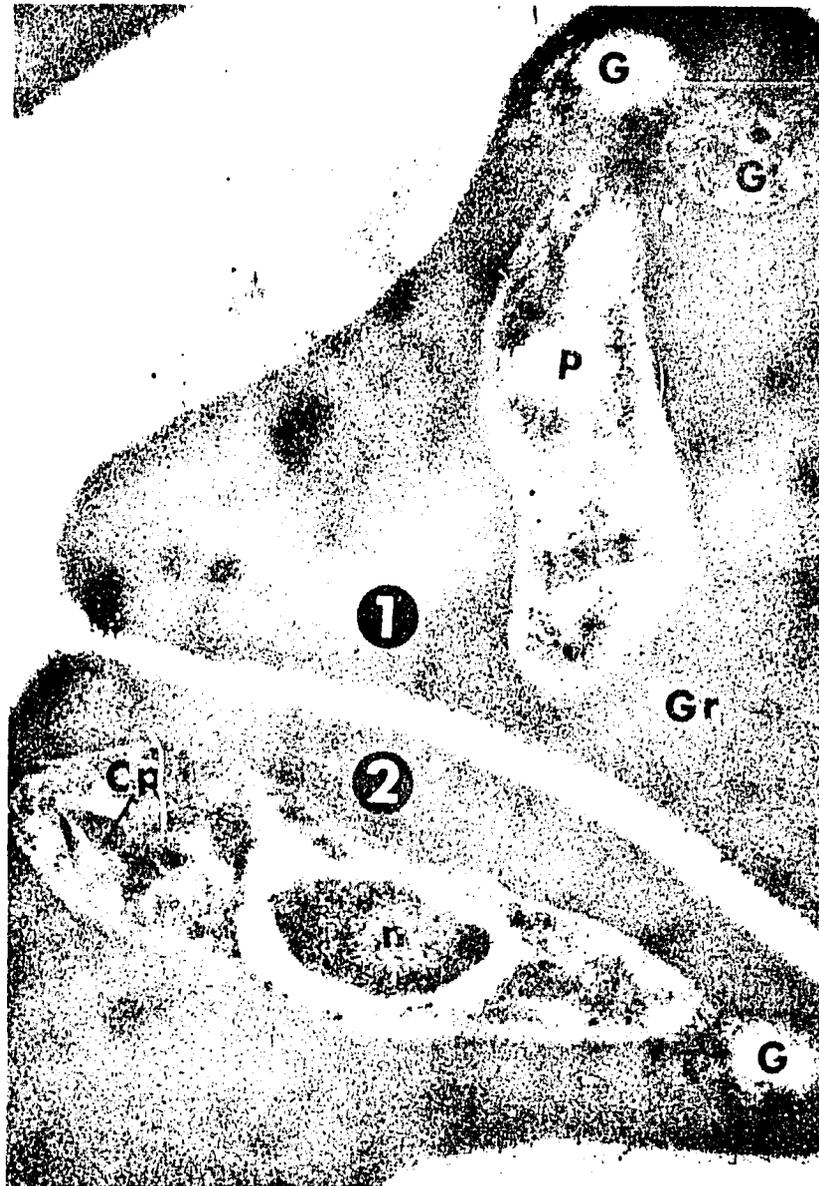
**FIGURA 8.** Microfotografía de un glóbulo rojo (Gr) que muestra tres parásitos de *Babesia bigemina*, en distintas formas evolutivas (A, B, C). La forma A muestra un parásito casi adulto con núcleo grande (n) y cuerpos polares (Cp). 64.600X.



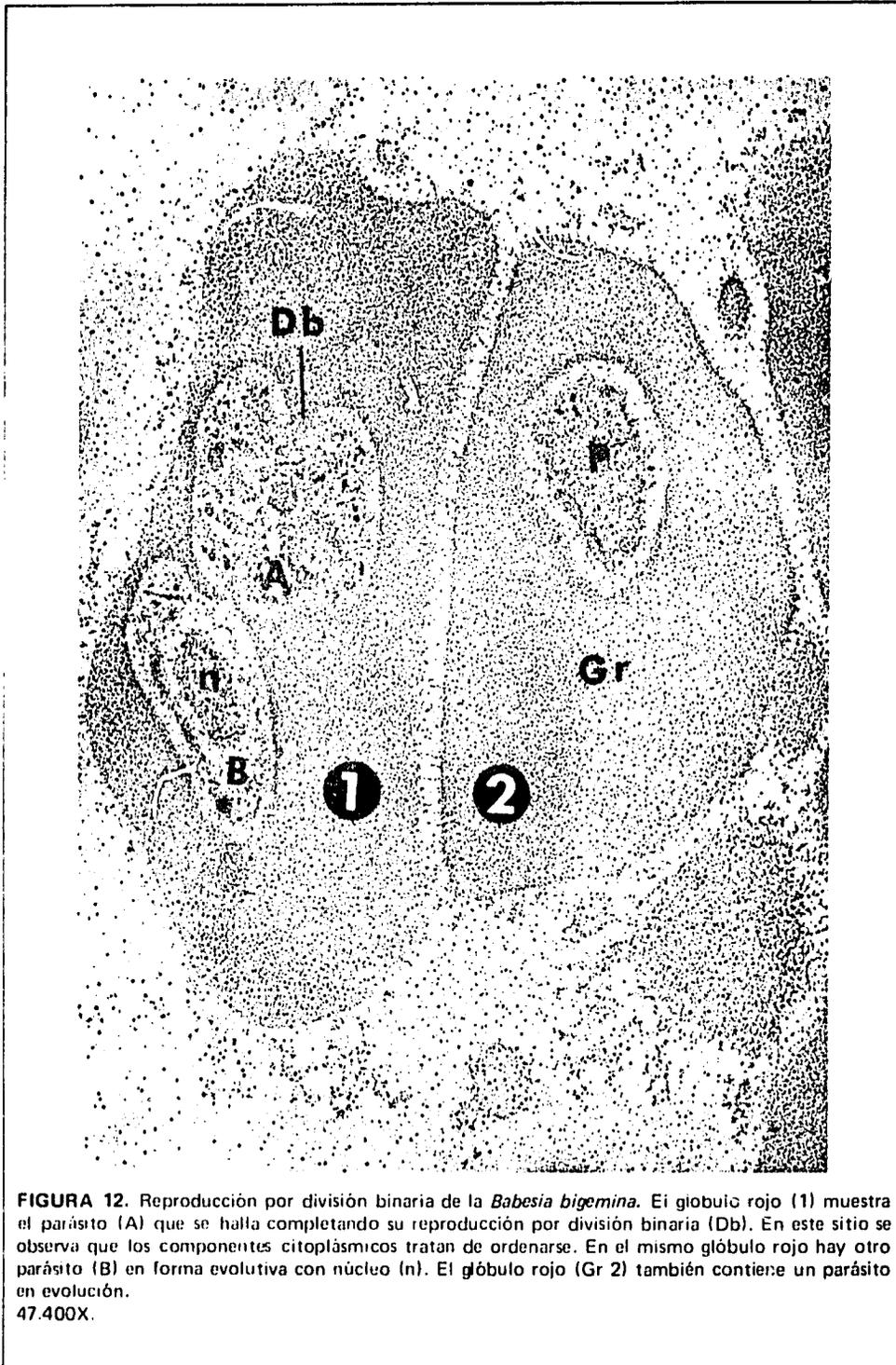
**FIGURA 9.** Forma gemativa de reproducción de *Babesia bigemina*. En el eritrocito (2) el parásito (P) entra en proceso de gemación para formar un nuevo parásito; la comunicación entre ambos se establece a través de un pequeño espacio (G). El glóbulo rojo (Gr 1) contiene un parásito en evolución (P).  
51,800X.



**FIGURA 10.** Forma gemativa de reproducción de *Babesia bigemina*. El glóbulo rojo (Gr 1) contiene el parásito (P) que ha completado su reproducción por gemación. El nuevo parásito, más pequeño y redondeado, aparece en la porción inferior del parásito adulto. El glóbulo rojo (2) contiene un parásito en proceso de gemación.  
41,200X.



**FIGURA 11.** Dos glóbulos rojos (1, 2) que muestra varios aspectos de la reproducción de la *Babesia bigemina* por gemación. Los nuevos parásitos se indican como G (gemas). El parásito en el glóbulo rojo (2) tiene núcleo bien definido (n) y cuerpos polares (Cp). 8.100X.



**FIGURA 12.** Reproducción por división binaria de la *Babesia bigemina*. El glóbulo rojo (1) muestra el parásito (A) que se halla completando su reproducción por división binaria (Db). En este sitio se observa que los componentes citoplásmicos tratan de ordenarse. En el mismo glóbulo rojo hay otro parásito (B) en forma evolutiva con núcleo (n). El glóbulo rojo (Gr 2) también contiene un parásito en evolución.  
47.400X.

### 3.2. REPRODUCCION

La forma más común observada en la reproducción de la *Babesia* es la denominada gemación, en la cual el parásito empieza a formar pseudópodos que parten del citoplasma estableciéndose unión entre éstos y el parásito; a través de éstos pasan componentes del citoplasma y del núcleo que contribuyen a la formación del nuevo parásito. El resultado es la formación de una o dos células hijas que tienen al momento de ser formadas de 0.5 a 0.8 micras (Figuras 9, 10 y 11).

La composición de estas células recién formadas es igual a la del parásito adulto aunque muestra tener un citoplasma más claro. Otra forma de reproducción observada es la denominada división binaria o fisión binaria. En esta forma la membrana citoplásmica va sufriendo un proceso de invaginación por el cual se va haciendo la división; los componentes citoplásmicos se van colocando a uno y otro lado del parásito y el núcleo toma una posición central (Figura 12). Estas dos formas de reproducción fueron las únicas que se observaron.

### 3.3. ALIMENTACION

Aunque en este estudio el mecanismo de alimentación de la *B. bigemina* no ha sido revelado en forma muy clara, parece realizarse por el proceso conocido como pinocitosis. Partículas de densidad similar a la del huésped han sido observadas en los estados evolutivos del parásito (Figuras 9 y 10) las cuales serían incorporadas en el mismo momento de desarrollarse la gemación.

No se observaron restos de hemozoína, detectados en otros tipos de parásitos hemáticos. Estudios posteriores en microscopio electrónico pueden llevar a conocer mejor el mecanismo de alimentación.

## 4. DISCUSION

La ultraestructura de la *B. bigemina* se asemeja estrechamente a la de la *Babesia rodhaini* (28), *Babesia caballi* (31), *Babesia canis* (3) y *Plasmodium fallax* (14). Tanto en *B. caballi* como en *B. bigemina* no se encuentran mitocondrias. De acuerdo con Rudzinska y Trager (28), no se hallaron mitocondrias en *P. berghei*; sin embargo estos observaron estructuras compuestas de membranas concéntricas similares a ciertas formas de mitocondrias desarrolladas en algunos estados de espermatogenesis de *Helix* (2). Esto hace pensar que las organelas concéntricas pueden asumir funciones mitocondriales (25).

Como el *P. berghei*, la *Babesia* posee una doble membrana citoplásmica alargada y vacuolada con terminaciones de aspecto vesiculoso; las funciones de estas vacuólas es desconocida pero se cree que puedan representar un reservorio de fluidos de importancia para un parásito intracelular rodeado de un denso citoplasma (25).

El retículo endoplásmico tiene forma granular que tiende a formar vesículas de aspecto liso o rugoso pero que en la *B. bigemina* revela ser menos complicado y diferenciado que en las especies de *Plasmodium*.

De acuerdo con Rudzinska y Trager (28), la forma primitiva es la más común de la *Babesia* para la reproducción y ésta se hace por gemación y división binaria. Ambas formas de reproducción fueron reportadas previamente por distintos investigadores, utilizando el microscopio de luz (20, 36). De acuerdo con sus observaciones la reproducción comienza con la formación de dos u ocasionalmente cuatro pequeñas gemaciones, las cuales crecen al incorporarse más material citoplásmico y nuclear obtenido de la célula madre y el resultado es la formación de dos o más células hijas. Por lo tanto, la reproducción de la *Babesia* podría empezar por la forma gemativa y completarse con la forma de división binaria, de tal manera que la gemación correspondería a un paso preparatorio para la división binaria. Resulta difícil saber a ciencia cierta si ambos procesos están implicados en la reproducción de todas las especies de *Babesia*, ya que las observaciones descritas aquí se basan en estudios de material fijado y cortado en ultrasecciones.

El cuerpo de *B. bigemina* y el de *B. rodhaini* está cubierto por una membrana plasmática simple. A este respecto las especies del género *Babesia* difieren de los parásitos maláricos, los cuales poseen doble membrana plasmática (24, 26). En la *B. bigemina* las formas gemativas y las células hijas poseen también una membrana simple derivada de la membrana plasmática de la célula madre.

Es de interés anotar que *B. rodhaini*, un parásito intracelular de los glóbulos rojos del ratón, se alimenta del huésped en la misma forma que lo hacen los parásitos maláricos (28), lo cual consiste en tomar porciones grandes del huésped que por un proceso de invaginación penetran al parásito y forman las vacúolas de alimentación.

En la *Babesia*, sin embargo, no se encontraron pigmentos de hemozoína ni fuera ni dentro del parásito; aparentemente la forma de digestión es más completa en la *Babesia* que en los *Plasmodium*.

A pesar de las diferencias en el mecanismo de alimentación, las consecuencias de la parasitación hacia el huésped son siempre las mismas (29). En ambos tipos de parásitos todo el contenido del huésped pasa a ser incorporado al cuerpo del parásito donde es digerido.

La suposición de que la *B. bigemina*, un parásito hemático, puede alimentarse del huésped en la misma forma que otros parásitos, puede ser complementado con este trabajo en microscopio electrónico (28). Como en los parásitos maláricos, cuerpos ovales grandes de la misma densidad y estructura del huésped se encontraron dentro de las babesias y no hay duda de que ellos representan partes del eritrocito.

Estos requerimientos específicos en dos tipos de organismo no muy estrechamente relacionados, hace pensar de que existan sustancias en el citoplasma del huésped responsables de tal efecto.

La ingestión de elementos nutritivos en forma de gotas, parece ser un fenómeno recientemente revelado en microscopio electrónico en una gran variedad de células (4, 9, 21, 22, 30, 37). Lewis (18) fué el primero que introdujo el término de pinocitosis. De gran importancia en la alimentación de estos parásitos es que la pinocitosis puede ser inducida por determinadas sustancias (5, 7, 10, 14, 15).

La primera observación de engolfamiento de flúidos la hizo Edwards (10) en amebas. Más información detallada de la pinocitosis fué relatada por Lewis (18) en macrófagos y células de tejidos en cultivo y más tarde por Mast y Doyle (19) en varias especies de amebas. Las investigaciones posteriores establecieron que la pinocitosis puede no solamente ser inducida por sales inorgánicas sino también por gluconato de calcio y albúmina de huevo.

Estudios experimentales de pinocitosis hechos por Holter y Marshall (15), mostraron que un número variado de proteínas pueden ser efectivas como favorecedoras del fenómeno. En el estudio de la pinocitosis y su mecanismo parece que los coadyuvantes actúan directamente sobre la membrana plasmática por adherencia y contacto continuo (5). Esto trae como consecuencia un cambio en el estado físico lo que da como resultado la invaginación.

Estos procesos son similares en el mecanismo de alimentación de los parásitos del género *Babesia* y nos lleva a pensar que algunas proteínas y sales del citoplasma del eritrocito, las cuales representan el medio del parásito, pueden inducir el proceso de pinocitosis, siendo responsables de la invaginación de sustancias del huésped hacia el parásito. Desde que el proceso se lleva a cabo en el citoplasma de un huésped, se puede decir que se trata de un proceso de pinocitosis (28). Esta forma de alimentación del parásito es la más simple y probablemente la más eficiente para la *Babesia*.

La porción cono del parásito descrita y denominada así por Gustafson et al. (13) en el *Toxoplasma* y más tarde por Hepler et al. (14) en *P. fallax*, aparece en la parte anterior aguda del parásito y tiene función en la penetración del parásito dentro del huésped según dichos autores, hipótesis que nosotros encontramos interesante. Garnham et al (12) han sugerido que el par de organelas observadas en los esporozoitos de los parásitos maláricos pueden contener enzimas proteolíticas que actúan lisando el citoplasma del huésped y facilitando así la penetración del parásito en él.

En este trabajo hemos encontrado las mismas estructuras representadas en los cuerpos polares, los cuales se comunican con la porción cono del parásito por medio de pequeños canales. Estudios posteriores en microscopio electrónico pueden aclararnos si estos mecanismos en la *B. bigemina* tienen la misma función que en el *Toxoplasma* y que en el *P. fallax*.

## 5. RESUMEN

Se ha determinado la morfología y algunos aspectos relacionados con los mecanismos de reproducción y alimentación de la *B. bigemina* tal como se revela en el microscopio electrónico.

Se reportan estudios preliminares en otros tipos de parásitos hemáticos incluyendo estudios en varias especies de *Babesia* como son *B. canis*, *B. caballi* y *B. rodhaini*. Hasta el presente no se conocen trabajos de microscopio electrónico en parásitos del género *Babesia* que afectan a la especie bovina.

La cepa de *B. bigemina* fué obtenida de animales infectados naturalmente en una región del Departamento del Valle del Cauca en Colombia y se purificó en animales esplenectomizados hasta cuando la parasitemia fué alta (25<sup>o</sup>/o).

La *B. bigemina* revela tener varias formas, encontrándose la forma de pera como la más común pero también se hallan formas redondeadas, cónicas u ovals. El tamaño promedio es de 4,5 micras de largo por 2,3 micras de ancho, llegando a alcanzar hasta 6,5 micras de largo. Las formas jóvenes del parásito tienen 1,5 por 2,5 micras.

El hemoparásito muestra tener una membrana citoplásmica densa y simple, y retículo endoplásmico de aspecto vesicular compuesto de gránulos de diferentes densidades. El citoplasma aparece como una masa homogénea en el cual se aprecian otras estructuras como vacúolas, las que se observan de aspecto claro, esféricas u ovoides, cuerpos polares. (organelas ovaladas generalmente de 0,3 a 0,5 micras de diámetro) que se comunican con la porción cono del parásito por medio de canales. El núcleo es grande ocupando un tercio a un cuarto del volumen del parásito con membrana nuclear simple sin presencia de nucleolos y forma redondeada.

La reproducción de la *B. bigemina* parece realizarse en dos formas siendo la más común la reproducción por gemación, al final de la cual se forman dos o más gemas (células hijas). Otra forma de reproducción es por división binaria. Ambas formas fueron observadas pero puede tratarse en general de un solo proceso en el cual la gemación correspondería a un paso preparatorio para la división binaria.

El mecanismo de alimentación no ha sido revelado en forma muy clara. Los cuerpos polares, componentes citoplásmicos, pueden asumir la función de reservorio de alimentación del parásito. La suposición de que *B. bigemina* puede alimentarse en la misma forma que han reportado varios autores en otros parásitos hemáticos, ingiriendo grandes masas del huésped por un proceso conocido como pinocitosis, puede ser complementado con este trabajo. No se encontraron residuos de digestión de hemoglobina en el parásito, lo que indica que la digestión es más completa en la *Babesia* que en otros parásitos hemáticos.

## 6. SUMMARY

The morphology and some aspects related to the reproductive and feeding mechanism of the *Babesia bigemina* have been studied by means of electron microscopy.

Although there are reports in the literature on the fine structure of *Babesia canis* which affects dogs, *Babesia calLalli* which affects horses, and *Babesia rodhaini* which affects rodents, there is no report on the ultrastructure of *B. bigemina* which infects cattle.

*B. bigemina* was isolated from naturally infected cattle from Valle del Cauca, Colombia and maintained in splenectomized calves in the Laboratorio de Investigaciones Médicas Veterinarias in Bogotá. Blood samples were collected from the splenectomized animals at a time when the percentage of parasitized erythrocytes was 25 o/o, and these samples were used for electron microscopic studies.

By means of the electron microscope different stages of *B. bigemina* were revealed such as oval, conoid and most commonly, pear shaped. The sizes of these forms were 2,5 to 6,5 microns in length by 2,3 microns in width. The young forms of the parasite were 1,5 by 2,5 microns. All these forms parasites are surrounded by a dense cytoplasmic membrane which contained endoplasmic reticulum in the form of vesicles; these vesicles are composed of granules of different density. The endoplasmic reticulum appears as a homogenous mass with transparent vacuole structures which are oval and spherical in shape. In addition to the endoplasmic reticulum well defined dense polar bodies were found which appeared as oval shaped organelles, wich communicated with the conoid part of the parasite by canals. The nucleus is the largest internal structure of the parasite and occupies one fourth to one third of its body. The nucleus is surrounded by a single membrane. Nucleoli were not revealed by electron microscopy.

Reproduction of *B. bigemina* appears to be carried out in two ways: by budding and by binary fission. On the basis of these observations it is no clear which means of reproduction is more predominant. It is possible that both forms take place at the same time.

The feeding mechanism is not apparent. It appears that polar bodies play some role in this mechanism. These polar bodies could assume the function of food reservoirs of the parasite. It was also revealed that food vacuoles are similar to those in malarial parasites. The formation of food vacuoles probably results from an end process of pinocytosis as was described for *Plasmodium* species. We believe that both processes are involved in the feeding mechanism of *Babesia* parasites. Results of his study confirm the previously reported observation that there is no formation of pigment granules in *Babesia*: this implies that digestion of the host hemoglobin is complete: in contrast malarial parasites form hemozoin, a blood pigment, as an end product of metabolism.

## 7. BIBLIOGRAFIA

1. ALKAWA, M. 1966. The Fine Structure of the Erythrocytic Stages of Three Avian Malarial Parasites, *Plasmodium fallax*, *p. lophurae* and *p. cathemerium*. *am. j. trop. med. hyg*; 15, 449-71.
2. BEAMS, H.W. y T.N. TAHMISIAN. 1954. Structure of the Mitochondria in the Male Germ Cells of *Helix* as Revealed by the Electron Microscope. *Exp. Cell Res.*, 6, 87-93.
3. BAYER, M.E. y K.H. DENNIG. 1961. Electron Microscopy of *Babesia canis*. *Z. Tropenmed. u. Parasitol.*, 12, 28-35.
4. BENNETT, H.S. 1956. The Concepts of Membrane Flow and Membrane Vesiculation as Mechanisms for Active Transport and Ion Pumping. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 2 (Suppl.), 99-103.
5. BRANA, P.W. 1958. A Study of the Mechanism of Pinocytosis. *Exptl. Cell Research*, 15, 300-13.
6. COX, F.E.G. y K. VICKERMAN. 1966. Pinocytosis in *Plasmodium vinckei*. *Ann. Trop. Med. Parasit.*, 60, 293-6.
7. CHAFMAN-ANDRESEN, C. y H-HOLTER. 1955. Studies on the Ingestion of C14 Glucose by Pinocytosis in the Amoeba *Chaos chaos*. *Exptl. Cell Research*, 3 (Suppl.), 52-63.
8. DUNCAN, D.; J. STREET; S.R. JULIAN y D.O. MICKS. 1959. Electron Microscopic Observations on the Gamete cytes of a Malarial Parasite (*Plasmodium cathemerium*). *Texas Rep. Biol. Med.*, 17, 314-22.
9. DEMPSEY, E.W. 1953. Electron Microscopy of the Visceral Yolk sac Epithelium of the Guinea Pig. *Am. J. Anat.*, 93, 331-63.
10. EDWARDS, G. 1925. Formation of Foodcups in Amoeba Induced by Chemicals. *Biols. Bull. Marine Biol. Lab.* 48, 236-9.
11. FLETCHER, K.A. y B.Q. MEEGRAITH. 1962. Intracellular Phagotrophy by *Plasmodium knowlesi*. *Am. J. Trop. Med. Parasit.*, 56, 492-5.
12. GARNHAM, P.C.; R.G. BIRD y J.R. BAKER. 1960. Electron Microscope Studies of Motile Stages of Malaria Parasites. I. The Fine Structure of the Sporozites of Haemamoeba (*Plasmodium gallinaceu*). *Trnas. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 54, 274-8.

13. GUSTAFSON, P.V.; H.D. AGAR y D.I. CRAMER. 1954. An Electron Microscope Study of Toxoplasma. Am. J. Trop. Med. Hyg., 3, 1008-21.
14. HEPLER, P.K.; C.G. HUFF y H. SPRINZ. 1966. The Fine Structure of the Exoerythrocytic Stages of *Plasmodium fallax*. J. Cell. Biol., 30, 333-58.
15. HOLTER, H. 1959. Problems of Pinocytosis, with Special Regard to Amoebae. Ann. N.Y. Acad. Sci., 78, 524-37.
16. JERUSALEM, C. y U. HEINEN. 1965. Elektronenmikroskopische Untersuchungen am Malariaerreger (*Plasmodium berghei*) in polychromatischen and oxyphilen Erythrozyten. Z. Tropenmed. Parasit., 16, 377-94.
17. LADDA, R.; J. ARNOLD y D. MARTIN. 1965. Electron Microscopy of Erythrocytic Forms of *Plasmodium falciparum* in Human Volunteers and *Plasmodium berghei* in the Rat. 14 th Annual Meeting, Am. Soc. Trop. Med. Hyg., New Orleans, La.
18. LEWIS, W.H. 1931. Pinocytosis. Bull. Johns Hopkins Hosp. 49, 17-23.
19. MAST, S.O. y W.L. DOYLE. 1933. Ingestion of Fluid by Amoeba. Protoplasma, 20, 555-60.
20. NUTTALL, G.H.F. y G.S. GRAHAM-SMITH. 1908. The Mode of Multiplication of *Piroplasma bovis* and *P. pitheci* in the Circulating Blood Compared with that of *P. cunis* with Notes on Other Species of Piroplasma. Parasitology, 1, 134-42.
21. PALADE, G.E. y P. SIEKEVITS. 1956. Liver Microsomes. J. Biophys. Biochem. Cytol., 2, 171-200.
22. PEASE, D.C. 1956. Infolded Basal Plasma Membranes Found in Epithelia Noted for their Water Transport. J. Biophys. Biochem. Cytol. (Suppl.) 2, 203-8.
23. RISTIC, M. 1966. The Vertebrate Development Cycle of *Babesia* and *Theileria*. Biology of Parasites. p.p. 127-141. Academic Press, Inc. New York.
24. RUDZINSKA, M.A. y W. TRAGER. 1957. Intracellular Phagotrophy by Malarial Parasites: An Electron Microscope Study of *Plasmodium lophurae*. J. Protozool. 4, 190-9.

25. ----- 1959. Phagotrophy and Two New Structures in the Malaria Parasite *Plasmodium berghei*. J. Biophys. Biochem. Cytol., 6, 103-12.
26. RUDZINSKA, M.A.; R.S. BRAY y W. TRAGER. 1960. Intracellular Phagotrophy in *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium gonderi*. J. Protozool. 7 (Suppl.), 24-5.
27. ----- 1961. The Role of the Cytoplasm During Reproduction in a Malarial Parasite (*Plasmodium lophurae*) as Revealed by Electron Microscopy. J. Protozool., 8, 307-22.
28. ----- 1962. Intracellular Phagotrophy in *Babesia rodhaini* as Revealed by Electron Microscopy. J. Protozool., 9, 279-88.
29. RUDZINSKA, M.A.; W. TRAGER y R. S. BRAY. 1965. Pinocytotic Uptake and the Digestion of Hemoglobin in Malaria Parasites. J. Protozool., 12, 563-76.
30. RHODIN, J. 1954. Correlation of Ultrastructural Organization and Function in Normal and Experimentally Changed Proximal Convoluted Tubule cells of the Mouse Kidney. Aktiebolaget Godvil, Stockholm.
31. SIMPSON, C.F.; C.E. BILD and H.E. STOKLIKER. 1963. Electron Microscopy of Canine and Equine Babesia. Am. J. Vet. Research, 5, 408-414.
32. TOBIE, J.E. y G.R. COATNEY. 1961. Fluorescent Antibody Staining of Human Malaria Parasites. Exp. Parasit., 11, 128-32.
33. TRAGER, W. 1966. Comments on Ultrastructure. Mil. Med. 131, (Suppl.), 1009-10.
34. TRAGER, W.; M.A. RUDZINSKA y P. BRADBURY. 1967. The Fine Structure of *Plasmodium falciparum* and Its Host Erythrocytes in Natural Malarial Infections in Man. Bull.
35. VELASQUEZ, J.Q. 1933. Contribución al Estudio de la Piroplasmosis de los Animales Domésticos en Colombia. Revista. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. Nac. Colombia. 8: 67-106.
36. WENYON, C.M. 1926. Protozoology, William Wood & Co., New York.
37. YAMADA, E. 1955. The Fine Structure of the Gall Bladder Epithelium of the Mouse. J. Biophys. Biochem. Cytol. 1, 445-58.

#### FE DE ERRATAS

- Página 90. Primer renglón dice: B. artentina, debe decir: B. argentina.
- Página 91. Cuarto párrafo de 2. MATERIALES Y METODOS, tercer renglón, dice: diamante, debe decir: diamante.
- Página 109. Cuarto párrafo, cuarto renglón dice: Yound, debe decir: Young.
- Página 110. Cita bibliográfica No. 12, cuarto renglón, dice: P. gallinaceu,) .. Trnas, debe decir: P. gallinaceum). Trans.
- Página 112. Cita bibliográfica No. 34. Falta: World Health Organ 35:883.