

# Ação patogênica das formas exoeritrocitárias do *Plasmodium gallinaceum*

1. Investigações preliminares
2. Prova terapêutica da ação patogênica

POR

W. Lobato Paraense

(Com 9 tabelas, 6 gráficos, 4 estampas, sendo 3 coloridas e 7 figuras no texto)

## 1. INVESTIGAÇÕES PRELIMINARES

Depois da descoberta, por James & Tate (1937), das formas exoeritrocitárias (\*) do *Plasmodium gallinaceum*, numerosos outros pesquisadores têm se ocupado do seu estudo. De um modo geral, o resultado desses trabalhos tem demonstrado que as características essenciais do ciclo exo do *P. gallinaceum* são semelhantes às do ciclo exo das demais espécies de plasmódios nas quais este ciclo tem sido bem estudado.

Em dois artigos anteriores (1944, 1945) expus de maneira resumida o estado dos conhecimentos sobre a questão do ciclo exo em geral. Antes de iniciar a exposição dos assuntos que constituem o objeto deste trabalho, detalharei mais algumas noções sobre o ciclo exo do *P. gallinaceum* em particular.

### O CICLO EXO DO *P. GALLINACEUM*

A transmissão experimental do *P. gallinaceum* de uma ave a outra é feita pela inoculação de esporozoítos ou de sangue parasitado.

**Inoculação de esporozoítos.** Pode ser realizada por picada de mosquito infectado (geralmente usa-se o *Aedes aegypti*) ou por injeção de triturado de glândulas salivares portadoras de esporozoítos.

Nos casos inoculados com esporozoítos, as formas exo desenvolvem-se na fase inicial da infecção (período de incubação), antes do aparecimento

---

(\*) Neste trabalho o adjetivo *exoeritrocitário* e suas flexões serão enunciados na forma abreviada *exo*.

\* Recebido para publicação a 7 de Fevereiro de 1946.

dos parasitos nas hemácias. Este é um fato que se acha estabelecido com absoluta segurança, baseado no encontro de esquizogonias exo e na ausência de parasitos eritrocitários durante o referido período de incubação. Segundo o resultado das pesquisas feitas com o *P. gallinaceum*, a evolução dos esporozoítos inoculados realiza-se de acôrdo com a seguinte sucessão de fenômenos:

Chegados ao ponto de inoculação (tecido subcutâneo), os esporozoítos são englobados pelas células retículo-endoteliais existentes no derma, ou penetram ativamente nas referidas células. Este mecanismo não está ainda elucidado, mas é certo que os esporozoítos, algumas horas depois de inoculados, são encontrados no interior de elementos retículo-endoteliais do tecido dérmico. É possível que uma parte dêles seja arrastada pela corrente sanguínea para os órgãos profundos, ou siga mais lentamente pelos trajetos linfáticos. Atingindo a intimidade de uma víscera, os esporozoítos se alojam dentro de células do sistema retículo-endotelial (SRE), onde evoluirão como se estivessem em células análogas do tecido subcutâneo. Nos elementos do SRE os esporozoítos se multiplicam, iniciando o ciclo exo. Através de um processo esquizogônico dão origem, no ponto de inoculação, a descendentes que são levados aos órgãos internos pela corrente circulatória, e que continuam nas células retículo-endoteliais destes órgãos a mesma evolução assexuada. É possível que aí já se encontrem elementos parasitários análogos, derivados da multiplicação dos esporozoítos chegados a êsses órgãos através da circulação sanguínea ou linfática. De fato, na segunda metade do período de incubação têm sido encontradas formas exo, geralmente em pequena quantidade, no interior de células retículo-endoteliais, principalmente do sistema nervoso central.

Os parasitos exo multiplicam-se dentro das células do SRE, nos diferentes órgãos possuidores de elementos deste sistema celular. Podem ser vistos no fígado, baço, rim, pulmão, medula óssea, etc., e de maneira muito conspícua no sistema nervoso central, onde ocupam as células endoteliais que revestem os capilares sanguíneos. Depois de certo número de gerações dessa natureza, os merozoítos exo acham-se aptos a infectar as hemácias. Este fato determina o fim do período de incubação, durante o qual não existem parasitos nos glóbulos vermelhos. Chegados a este ponto de sua evolução, os merozoítos tomam um entre dois destinos: grande parte cai na circulação sanguínea, invadindo os glóbulos vermelhos para realizar o conhecido ciclo eritrocitário, enquanto uma parte continua a parasitar o SRE.

Nas relações entre os dois ciclos tem grande importância o fato de que, nos casos infectados com esporozoítos, o ciclo exo precede o eritrocitário. Como veremos em seguida, não acontece o mesmo nos casos infectados com sangue malárico.

**Inoculação de sangue.** Nos casos de malária provocada pela inoculação de sangue parasitado, as formas exo aparecem secundariamente, isto é, depois de ficar instalada a infecção dos glóbulos vermelhos. É compreensível que tal aconteça. É fato indiscutível que os plasmódios, evoluindo nas hemácias, realizam um ciclo esquizogônico no fim do qual os merozoítos assim originados libertam-se na corrente circulatória, reiniciando o mesmo ciclo. Em consequência, se introduzirmos sangue malárico nas veias de um indivíduo receptivo, os parasitos continuarão o seu desenvolvimento como germes repicados de um meio de cultura a outro meio idêntico. Tanto que é possível suprimir o período de incubação injetando-se um número muito elevado de parasitos sanguíneos por via intravenosa, o que não acontece quando se injetam esporozoítos mesmo em doses maciças. Isto porque, enquanto os esporozoítos têm de realizar previamente o ciclo exo preparatório à infecção sanguínea (período de incubação), na inoculação de sangue malárico a modali-

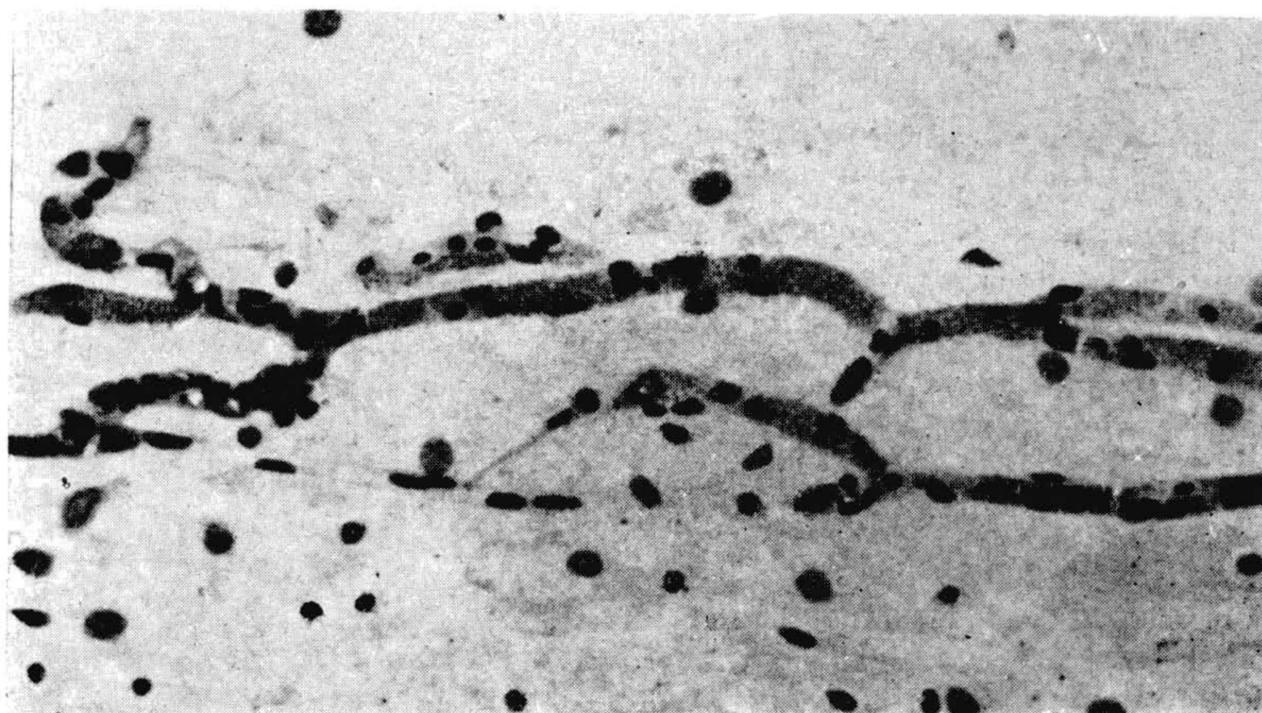


Fig. 1 — *P. gallinaceum*. Formas exo no endotélio de um capilar cerebral. A estrutura do vaso está bem conservada, como acontece habitualmente em esfregaços do sistema nervoso central. Observa-se a disposição reticular conseguinte à anastomose recíproca dos ramos vasculares. x 300. — Foto J. Fontes.

dade evolutiva dos parasitos injetados não é interrompida, instalando-se imediatamente o ciclo eritrocitário no novo indivíduo. O ciclo exo, ao contrário, comparecerá depois, porque para o seu estabelecimento é necessário um prazo de readaptação dos parasitos ao SRE.

#### REFERÊNCIAS À AÇÃO PATOGÊNICA DAS FORMAS EXO

Desde os primeiros trabalhos de James & Tate sobre o *P. gallinaceum*, já citados, sabe-se que as formas exo deste plasmódio possuem acentuado tropismo para os endotélios dos capilares encefálicos. Nas infecções por este pa-

rasito, as formas exo podem ser encontradas em tôdas as vísceras possuidoras de células do SRE, em número proporcional à abundância das referidas células. No encéfalo, entretanto, a concentração parasitária atinge a sua máxima intensidade, e isto constitui a principal característica do ciclo exo do *P. gallinaceum*.

A observação dêsses aspectos, principalmente nas infecções intensas, como se vê nas figuras 1 a 3, sugere a idéia de que tão grande afluência de parasitos deve provocar modificações funcionais no ambiente em relação com o qual êles se encontram, modificações estas que se traduziriam em uma verdadeira ação patogênica.

Aliás, na bibliografia existente sôbre o ciclo exo dos plasmódios em geral, são encontradas referências a tal ação patogênica. Trata-se, porém, quase sempre, de simples considerações de natureza secundária, no texto de escritos dedicados a outros assuntos. Como será visto a propósito das citações feitas no decurso dêste trabalho, poucos são os autores cuja atenção foi dirigida à questão que nos interessa agora.

Nas suas observações sôbre o *P. elongatum*, verificou Raffaele (1936) que muitas vêzes as aves inoculadas morriam quando o parasitismo sanguíneo era ainda muito escasso, isto é, logo no início da invasão do sangue pelos primeiros trófozoítos. A característica dominante do quadro mórbido era intensa anemia, cuja gravidade não guardava relação com a destruição globular provocada pelo parasito. Nestes casos o exame das vísceras mostrava abundantes esquizogonias exo, promovendo acentuado bloqueio do SRE.

Na comunicação inicial sôbre o ciclo exo do *P. gallinaceum*, referem-se James & Tate a aves temporariamente curadas da infecção sanguínea pela administração de algumas doses de quinina, e que morreram depois, em consequência do desenvolvimento de grandes esquizontes no interior das células endoteliais dos capilares cerebrais. Em nota ulterior (1938) referem-se ainda a casos em que a presença de formas exo em grande quantidade no encéfalo de algumas aves coincidia com manifestações de paralisia generalizada. Em outro trabalho (1939), James assinala casos cujo êxito letal relaciona à abundância e vasta distribuição da esquizogonia exo.

Kikuth & Mudrow (1937) dizem que a multiplicação esquizogônica nos endotélios dos capilares cerebrais, nas infecções pelo *P. cathemerium*, pode provocar a oclusão da luz dos vasos e conseqüentes efusões sanguíneas. Julgam muito provável que essas formas, aparecendo em grande quantidade no cérebro, possam agir como causa de morte.

Também Rodhain (1939), apoiando-se nas verificações que fez em pingüins (*Spheniscus demersus* e *S. humboldti*) naturalmente infectados com o

*P. praecox*, diz que a invasão parasitária do SRE faz pensar na existência de uma ação patogênica local cerebral, além de representar um papel de ordem geral na gravidade da infecção palustre nos esfeniscídeos.

Num estudo sôbre a patologia da infecção pelo *P. gallinaceum*, chegou Jacobi (1939) à conclusão de que a multiplicação das formas exo é tão peri-

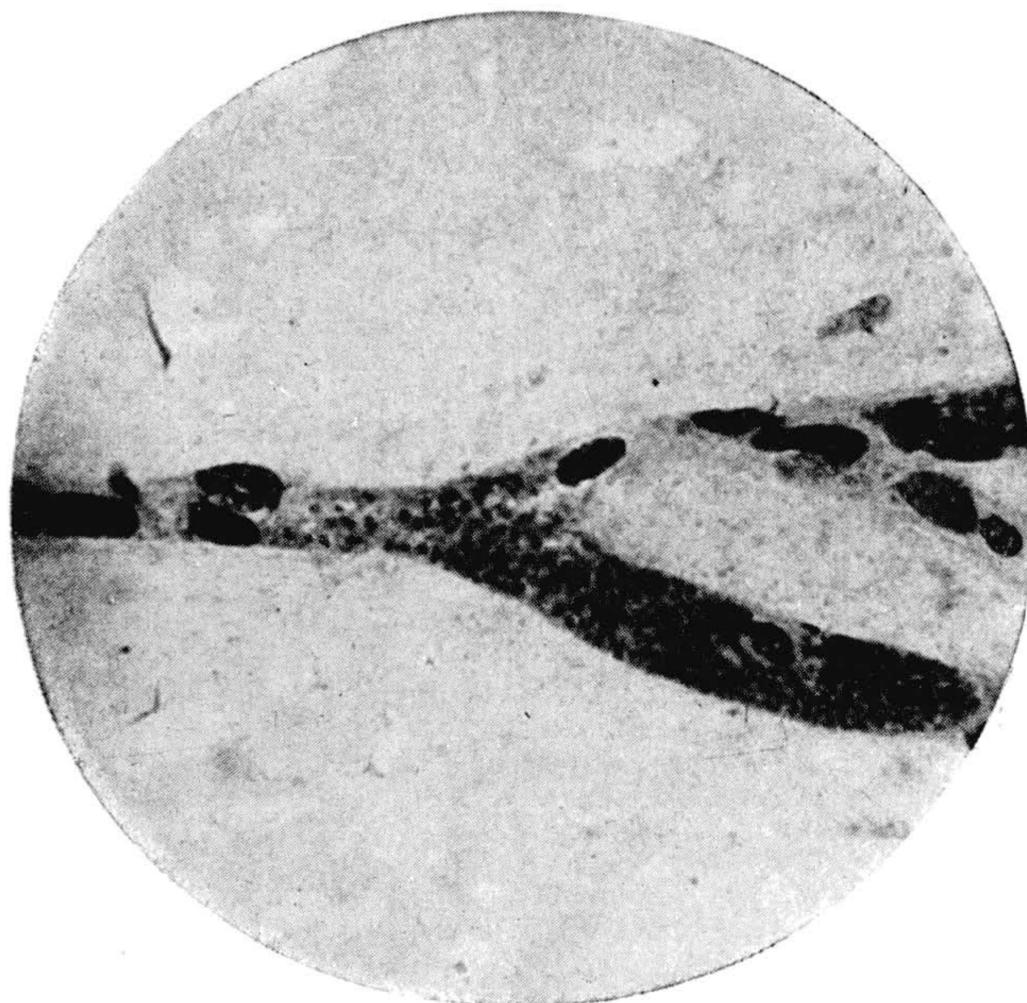


Fig. 2 — *P. gallinaceum*. Forma exo no endotélio de um capilar cerebral, x 700. — Foto L. F. Salazár.

gosa para o animal como o ataque eritrocitário agudo. Diz mais que a infecção por formas exo não é perceptível exteriormente, não confirmando a sintomatologia paralítica descrita por James & Tate.

Wolfson (1940) verificou, em canários inoculados com o *P. cathemerium*, que a incidência de esplenomegalia, infarto esplênico e hemorragias das meninges cerebrais é muito mais acentuada nas aves que apresentam esquizogonia exo do que naquelas em que tal esquizogonia não é encontrada.

Numa publicação em que estudam a ação de diversas sulfonamidas sôbre o *P. gallinaceum*, Freire & Paraense (1944) referem-se a aves que morreram na vigência do tratamento pela quinina e pela atebrina. Nestes animais foram encontradas esquizogonias exo, às vêzes em grande abundância, ao passo que a freqüência dos parasitos no sangue achava-se grandemente diminuída pela ação do medicamento. Constatações idênticas fizeram Coggeshall, Porter &

Laird (1944), em trabalho sôbre o mesmo assunto, publicado poucos meses depois.

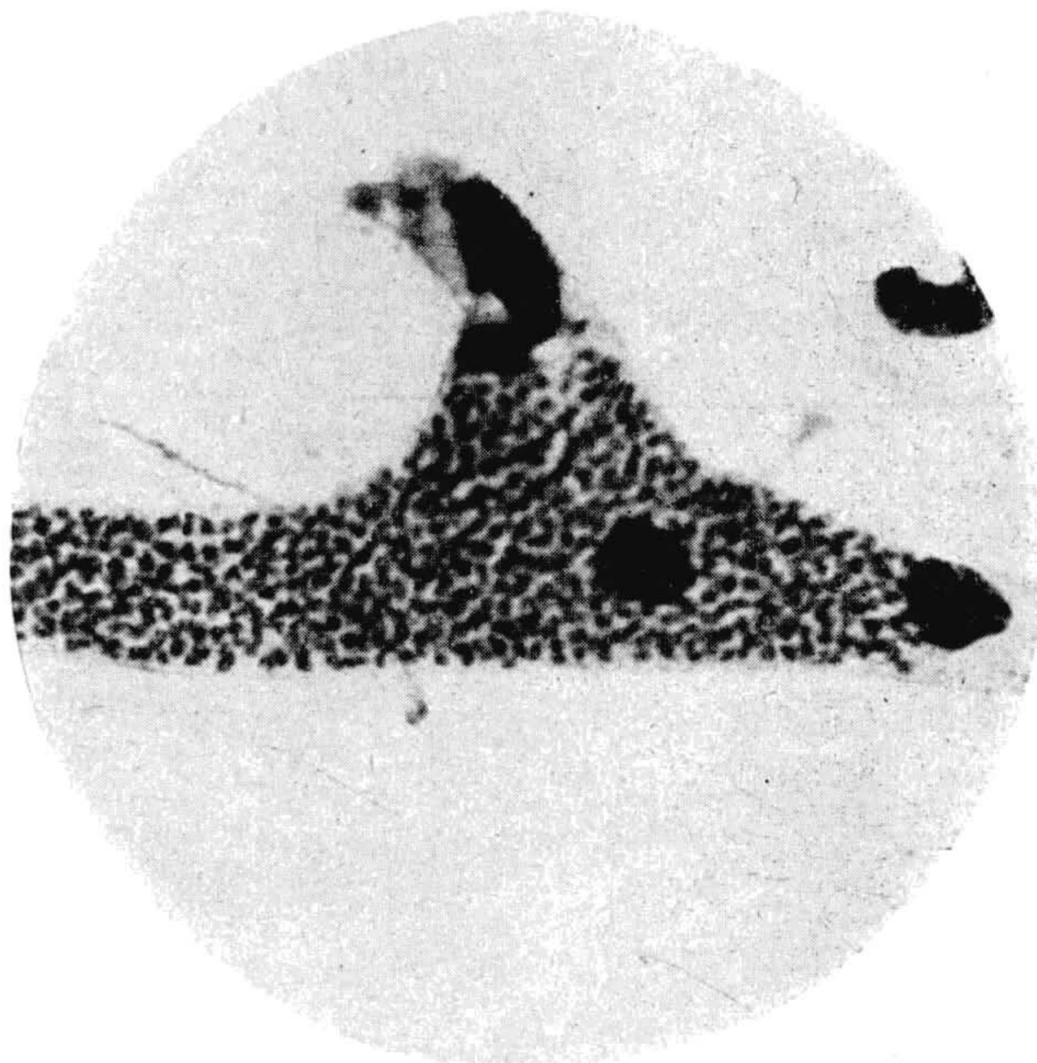


Fig. 3 — *P. gallinaceum*. Forma exo no endotélio de um capilar cerebral. Caso tratado com quinina. x 1.200. — Foto J. Fontes.

### PRIMEIRAS OBSERVAÇÕES

A idéia de investigar a ação patogênica das formas exo do *P. gallinaceum* foi-me sugerida por observações feitas durante uma pesquisa sôbre a atividade medicamentosa da quinina contra as formas eritrocitárias. Tendo inoculado um lote de 20 pintos jovens, observei que tôdas as aves testemunhas morreram em consequência da infecção sanguínea aguda, ao passo que os animais tratados não chegaram a apresentar grande número de parasitos nas hemácias. E' assim que, no 8.º dia da infecção, só restava o grupo de animais tratados. No 10.º dia observei que duas aves dêste grupo distinguam-se das demais pelo seu diverso comportamento. Enquanto as outras movimentavam-se vivamente e não demonstravam qualquer anormalidade, as duas aves referidas ficavam paradas a um canto da gaiola, com aspecto sonolento, cer-

radas as pálpebras, só despertando dêsse marasmo quando se fazia ruído perto das gaiolas. Então elas tornavam-se tão vivazes quanto as demais, porém daí a instantes voltavam ao mesmo estado sonolento. O sangue dessas aves apresentava cêrca de 5 % de hemácias parasitadas, exclusivamente por minúsculos trofozoítos. Êstes dois pintos foram sacrificados, sendo encontradas abundantíssimas formas exo nos endotélios da maioria dos capilares encefálicos e medulares examinados.

As aves restantes continuaram em tratamento pela quinina, morrendo tôdas entre o 14.º e o 17.º dias seguintes à inoculação. Apresentaram sempre, antes de morrer, a sintomatologia acima descrita, a qual se acentuava gradualmente até que o animal entrava em estado francamente comatoso. Algumas vêzes essa fase terminal de torpor durava dois ou três dias. Outras vêzes era mais rápida, e os animais morriam no mesmo dia em que ela se manifestava. Em todos êles foram vistas abundantíssimas esquizogonias exo, nos endotélios dos capilares do encéfalo e da medula espinal.

Êstes achados pareciam, pois, indicar que se tratava de um fato freqüente e digno de ser estudado.

### HEMATIMETRIA E HEMOGLOBINOMETRIA EM PINTOS NORMAIS

Os dados que encontrei na bibliografia a respeito do número de eritrócitos e do conteúdo de hemoglobina no sangue do *Gallus gallus* referem-se exclusivamente a animais adultos. O fato de serem utilizados nos meus trabalhos animais de baixa idade levou-me a fazer um ligeiro estudo prévio sôbre a questão, afim de tornar possível a comparação dos resultados conseguidos nas minhas verificações.

As determinações dos valores referidos foram feitas em 80 pintos normais (raças Leghorn branca, Rhode Island vermelha e Light Sussex), cuja idade variava entre 5 e 10 dias. Ocupei-me apenas dos glóbulos vermelhos e da hemoglobina. Não foi possível determinar também o hematócrito, o que permitiria estabelecer de uma vez os índices de volume e de saturação. Com as duas mensurações de que disponho, só foi possível calcular o índice de hemoglobina.

Os dados obtidos acham-se agrupados na tabela 1. Esses dados foram submetidos à análise estatística, encontrando-se os resultados na tabela 1-a.

TABELA 1

NUMERO DE HEMÁCIAS, CONTEUDO DE HEMOGLOBINA E INDICE DE HEMOGLOBINA ENCONTRADOS NO SANGUE DE 80 PINTOS NORMAIS COM 5-10 DIAS DE IDADE

HEMÁCIAS (10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	PRE- QUENCIA	HEMOGLOBINA (g/100 cm <sup>3</sup> )						INDICE DE HEMOGLOBINA (%)					
		6.0-6.9	7.0-7.9	8.0-8.9	9.0-9.9	10.0-10.9	11.0-11.9	26-28	29-31	32-34	35-37	38-40	41-43
1.70-1.79.....	1	1	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—
1.80-1.89.....	6	6	—	—	—	—	—	—	—	2	4	—	—
1.90-1.99.....	9	7	1	1	—	—	—	—	3	4	1	—	1
2.00-2.09.....	10	2	6	2	—	—	—	—	1	1	4	4	—
2.10-2.19.....	5	2	1	2	—	—	—	1	1	1	1	1	—
2.20-2.29.....	13	2	5	5	1	—	—	1	3	2	4	2	1
2.30-2.39.....	15	3	4	6	2	—	—	3	2	2	6	2	—
2.40-2.49.....	4	1	1	1	1	—	—	1	1	1	—	1	—
2.50-2.59.....	8	—	4	1	2	1	—	1	4	1	1	1	—
2.60-2.69.....	5	—	1	1	2	—	—	1	—	2	1	—	1
2.70-2.79.....	2	—	1	1	—	—	—	1	—	—	1	—	—
2.80-2.89.....	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2.90-2.99.....	1	—	—	—	1	—	—	—	—	1	—	—	—
3.00-3.10.....	1	—	—	—	1	—	—	—	1	—	—	—	—
TOTAIS.....	80	24	24	20	10	1	1	8	18	16	24	11	3

TABELA 1-A.

Intervalos totais, médias, desvios padrões e coeficientes de variação, com os respectivos erros padrões, segundo os dados obtidos pela hematimetria e hemoglobimetria, em 80 pintos normais, com 5-10 dias de idade.

ATRIBUTOS	INTERVALOS TOTAIS	MÉDIAS ± E. P.	D.P. ± E.P.	C.V. ± E.P
Hemácias (milhões/mm <sup>3</sup> ).....	1.76—3.08	2.24 ± .035	.315 ± .024	14.06 ± 1.132
Hemoglobina (g/100 cm <sup>3</sup> ).....	6.0—11.2	7.68 ± .126	1.13 ± .089	14.71 ± 1.186
Indice de hemoglobina (%).....	26—43	34 ± .461	4.12 ± .326	12.13 ± 0.973

Os animais examinados, assim como todos os outros utilizados nos meus trabalhos, são adquiridos com 1 dia de idade, em uma das casas vendedoras de aves nesta cidade. Chegados ao laboratório, são mantidos em observação durante 5 a 10 dias, em criadeiras aquecidas a eletricidade. Se morrem aves neste período, são elas examinadas, e no caso de ser constatada moléstia contagiosa todo o lote é abandonado. São tomadas as devidas precauções para

evitar a utilização de animais portadores de doenças. A alimentação dos pintos consta da mistura, em proporções racionais, das seguintes substâncias: fubá de milho, trigoilho moído, aveia moída, farinha de carne, sal de cozinha, carbonato de cálcio, leite integral em pó, germe de trigo, alpiste e óleo de fígado de cação, além de verduras picadas.

A determinação do número de glóbulos vermelhos é feita no hematímetro de Neubauer. O sangue, obtido por punção de uma veia da asa ou da perna, é aspirado na pipeta de Thoma e diluído a 1 % em solução de cloreto de sódio a 0.85 %. O sangue diluído é agitado durante 5 minutos no interior da pipeta e depois é colocada uma gota na câmara de contagem. Achando-se os glóbulos uniformemente distribuídos na célula, aguarda-se a sedimentação dos mesmos durante 10 minutos, e inicia-se então a contagem. Verifica-se o número de hemácias encontradas em 5 grupos de 20 quadrículas das menores, multiplica-se o resultado obtido por 4.000, e o produto representa o número de hemácias existente em  $1\text{mm}^3$  de sangue.

As determinações de hemoglobina foram feitas na Seção de Hematologia (chefiada pelo Dr. Walter O. Cruz), por gentileza do meu colega Dr. R. Pimenta de Mello. Foi usada a técnica da dosagem sob a forma de oxihemoglobina no colorímetro fotoelétrico de Klett-Summerson. São aspirados, em pipeta especialmente calibrada,  $20\text{mm}^3$  de sangue obtido por punção de uma veia da asa ou da perna. O sangue é colocado em tubo de hemólise, contendo  $5\text{cm}^3$  de solução de carbonato de sódio a 0.1 % em água destilada. Em seguida é feita a leitura no colorímetro, que indica a quantidade de hemoglobina existente na amostra examinada, expressa em gramas por  $100\text{cm}^3$  de sangue.

O índice de hemoglobina, que representa a quantidade média desta substância contida em um glóbulo vermelho, é obtido pela relação hemoglobina/hemácias, sendo o resultado expresso em micromicrogramas ( $\gamma\gamma$ ).

Os resultados médios obtidos ficaram um pouco abaixo dos menores valores encontrados pelos autores, e são os seguintes, com os respectivos erros padrões:

Hemácias. . . . .	$2.240.000 \pm 35.000$ por $\text{mm}^3$ de sangue ;
Hemoglobina. . . . .	$7.68 \pm 0.126$ g por $100\text{cm}^3$ de sangue ;
Índice de hemoglobina.	$34 \pm 0.461$ $\gamma\gamma$ por hemácia.

Para comparação destes dados com os de outros autores, recomendo a tabela existente no trabalho de Forkner (1929).

Êstes resultados fazem supor a existência de valores mais baixos nas aves muito jovens, como é o caso nesta série por mim examinada.

### TOLERÂNCIA DO ORGANISMO DAS AVES À QUININA

Das experiências planejadas para o presente trabalho constava o tratamento de grande parte dos animais com o cloridrato de quinina. Êste medicamento seria aplicado por via oral, em doses diárias correspondentes a 150 mg por quilo do corpo de cada animal. Porisso achei indicado fazer observações prévias sobre a tolerância a essa dose do medicamento, aplicada durante 20 dias seguidos. Foram assim tratados 10 pintos com 5 dias de idade contados no primeiro dia do tratamento. A quinina foi administrada por via oral, em solução aquosa injetada através de cateter diretamente no esôfago. Outro grupo de 10 pintos da mesma idade ficou para contrôle, sem tomar medicamento.

Os resultados estão representados na tabela 2. As aves submetidas à ação da quinina, assim como as testemunhas, foram examinadas no 1.º e no

TABELA 2

Número de hemácias e conteúdo de hemoglobina encontrados no sangue de pintos tratados com o cloridrato de quinina, durante 20 dias, e não tratados. Valores obtidos no início e no fim da experiência.

N.º	TRATADOS				N.º	NÃO TRATADOS			
	HEMÁCIAS (milhões/mm <sup>3</sup> )		HEMOGLOBINA (g/100 cm <sup>3</sup> )			HEMÁCIAS (milhões/mm <sup>3</sup> )		HEMOGLOBINA (g/100 cm <sup>3</sup> )	
	1.º dia	20.º dia	1.º dia	20.º dia		1.º dia	20.º dia	1.º dia	20.º dia
Q 1.....	2.17	2.04	6.8	7.8	T 1	2.42	2.38	9.6	7.4
Q 2.....	1.90	2.04	8.2	6.6	T 2	2.49	2.32	7.0	8.2
Q 3.....	2.30	2.38	6.0	6.8	T 3	1.98	1.90	7.2	6.4
Q 4.....	1.83	1.90	6.8	6.6	T 4	2.10	2.33	8.2	8.8
Q 5.....	2.36	2.29	7.4	7.6	T 5	2.00	2.11	7.8	7.0
Q 6.....	2.21	2.20	7.8	7.0	T 6	2.58	2.40	9.0	8.0
Q 7.....	2.00	2.04	7.0	8.2	T 7	2.23	2.27	8.4	7.2
Q 8.....	2.22	2.04	8.2	6.6	T 8	2.60	2.58	9.2	8.0
Q 9.....	2.37	2.56	7.6	7.6	T 9	1.95	2.20	6.0	8.4
Q 10.....	1.82	1.76	6.8	6.4	T 10	1.82	1.96	6.8	6.6
MÉDIAS.....	2.118	2.125	7.26	7.12	—	2.208	2.245	7.92	7.60

20.º dias da experiência, tendo-se em vista o número de glóbulos vermelhos e os valores de hemoglobina. Em seguida foram sacrificadas 5 das aves tratadas, para exame necroscópico e histológico das vísceras. As 5 restantes dêste grupo continuaram vivas, em observação.

Em nenhum dos pintos que tomaram quinina observou-se qualquer sinal que sugerisse a idéia de uma ação tóxica do medicamento. Também depois da experiência, as aves que não foram sacrificadas continuaram desenvolvendo-se normalmente.

Pelos resultados contidos na tabela 2, parece que as doses de quinina empregadas nesta série de animais não são capazes de provocar alterações do número de eritrócitos e da quantidade de hemoglobina. As médias encontradas no início e no fim da experiência, tanto nos animais tratados como nos testemunhos, estão contidas nos limites da normalidade, não havendo necessidade de submeter esses resultados a um teste de significação.

A observação necroscópica das 5 aves sacrificadas no fim do tratamento não revelou qualquer anormalidade, o mesmo acontecendo quanto ao aspecto histológico das vísceras examinadas (encéfalo, fígado e rins).

Em um trabalho de Kohlschütter, Zipf & Triller (1943) foram feitas observações sobre a toxicologia do cloridrato de quinina, durante estudos terapêuticos com o *P. gallinaceum*. Estes autores estabeleceram que a dose única mortal, por via oral, para frangos de 2 a 6 meses de idade, é de uns 860 mg por quilo do corpo. A dose diária capaz de matar o animal quando administrada durante 5 dias é de 570 mg por quilo. As doses moderadas, repetidas durante certo número de dias, provocam alguma perda de peso, mas não a morte. Não foram encontradas lesões no encéfalo das aves que apresentaram sintomas nervosos devidos às doses mortais.

A dose mínima mortal de cloridrato de quinina, segundo Freire & Paraense (1944), é de 100 mg para pintos de 30 g (cêrca de 2 dias de idade). Isto parece indicar que as aves mais jovens toleram doses muito maiores do medicamento.

E' possível afirmar, portanto, que o cloridrato de quinina, na dose utilizada nas experiências descritas a seguir (150 mg diários por quilo do corpo), não é capaz de provocar no organismo das aves outras modificações além daquelas causadas pela sua ação antiparasitária.

### EVOLUÇÃO DA INFECÇÃO TRATADA COM QUININA E DA INFECÇÃO NÃO TRATADA

A primeira experiência a ser descrita tornará possível comparar a infecção tratada com quinina e a infecção não tratada, quanto à evolução de ambas de um modo geral.

Nesta experiência, assim como nas outras que serão descritas a seguir, o dia da inoculação dos parasitos por via intravenosa é considerado como o primeiro dia da infecção sanguínea.

A intensidade do parasitismo sanguíneo é avaliada pela contagem do número de plasmódios existentes em 1.000 hemácias. Se levarmos em conta que, nos casos de forte infecção sanguínea, são freqüentes os glóbulos infectados por vários plasmódios (às vêzes até mais de 5), veremos que em tais casos são encontrados mais de 1.000 parasitos em 1.000 hemácias.

Entretanto, quando são vistos por êsse processo menos de 10 elementos parasitários (infecções iniciais ou latentes), a contagem é prolongada a 10.000 eritrócitos. Se até êste número não são encontrados parasitos, o preparado de sangue é considerado negativo.

O número de plasmódios obtido é dividido por 10 ou 100, conforme tenham sido examinadas 1.000 ou 10.000 hemácias, obtendo-se assim a freqüência de parasitos em 100 hemácias. Onde se lê que o número de parasitos é 10 %, isto significa terem sido encontrados 10 plasmódios em 100 hemácias.

A intensidade da infecção pelas formas exo nos preparados de encéfalo é avaliada pela contagem ao acaso de 100 segmentos de capilares sucessivamente encontrados, anotando-se o número daqueles cujos endotélios se apresentam parasitados. Não sendo encontradas formas exo, a verificação é prolongada a mais 100, e assim por diante, de modo que o resultado negativo é baseado no exame exaustivo do preparado.

Esta determinação numérica da infecção dos capilares pelas formas exo não pode deixar de ser muito arbitrária, se levarmos em conta a estrutura dos referidos endotélios e dos esquizontes exo. Sabendo-se que os endotélios são formações sinciciais, compreende-se a impossibilidade de serem isoladas unidades celulares para contagem de elementos parasitados. Por outro lado, as formas exo parecem ter um poder quase ilimitado de multiplicação esquizogônica, dando origem a grandes parasitos que invadem uma série de enérgides limítrofes. Em muitos casos não se pode saber se um dêstes grandes parasitos deriva da multiplicação de um só elemento inicial ou se é formado pela fusão de dois ou mais esquizontes vizinhos. Nestas condições, o melhor processo pareceu-me ser o da contagem de segmentos de capilares. Isto só é aplicável, entretanto, aos preparados do sistema nervoso central, nos quais são encontrados trechos de capilares às vêzes muito longos, maiores ainda que aquêle reproduzido na fig. 1, graças à estrutura peculiar da sua adventícia. Sabe-se que os capilares do sistema nervoso central são isolados da substância nervosa ambiente por meio dos espaços linfáticos perivasculares

de Virchow-Robin. Estes espaços são atravessados radialmente por finas fibrilas, que ligam a adventícia dos capilares à substância nervosa. Durante a manipulação dos preparados estas delicadas fibrilas rompem-se com grande facilidade, deixando os capilares isolados. Eles aderem à lâmina e se apresentam perfeitamente nítidos ao exame, com os seus contornos bem delimitados. Este aspecto pode ser observado em qualquer das figuras de capilares que ilustram este trabalho. O mesmo não acontece nos preparados dos outros órgãos, nos quais a adventícia dos capilares constitui uma formação bem desenvolvida que se continua intimamente com os tecidos circunjacentes, não permitindo que o vaso se desprenda com a sua estrutura intacta.

Para esta pesquisa foram inoculados 80 pintos Leghorn brancos, com 5 dias de idade. Cada animal recebeu, por via intravenosa,  $\frac{1}{10}$  cm<sup>3</sup> de sangue de um frango cujas hemácias achavam-se parasitadas na razão de 40 % (infecção aguda). A contagem das hemácias da ave doadora deu como resultado 1.625.000 por mm<sup>3</sup>, tendo sido inoculados, portanto, 65.000.000 parasitos em cada animal.

As aves inoculadas foram separadas em dois grupos iguais de 40 animais. Um lote foi tratado com quinina a partir do dia seguinte à inoculação. O outro ficou sem tratamento, servindo para controle.

Os dados principais desta experiência estão reunidos na tabela 3. Foram obtidos resultados interessantes, que forneceram sugestões para o desenvolvimento ulterior dos trabalhos.

Nas aves não tratadas a infecção sanguínea incrementou, como acontece usualmente, atingindo grande intensidade e provocando a morte de todas elas, entre o 4.º e 6.º dias da infecção. Em nenhuma foi possível encontrar formas exo nos preparados do sistema nervoso central.

Nos animais tratados a infecção comportou-se de maneira completamente diversa. Apesar de ter sido o tratamento iniciado no dia seguinte à inoculação, eram sempre encontrados glóbulos infectados. Inicialmente o número de parasitos era muito pequeno, raramente ultrapassando 0.1%. Este baixo nível manteve-se até o 7.º dia. A grande maioria dos parasitos era então constituída de trofozoítos. Quando eram encontrados elementos mais evoluídos, tratava-se quase sempre de esquizontes jovens, em fase de divisão inicial. Era excepcional o encontro de formas em divisão adiantada. Nos trofozoítos mais desenvolvidos e nos esquizontes mais ou menos crescidos constatavam-se nítidas alterações, apreciáveis a partir do 2.º dia do tratamento. Tais alterações consistiam principalmente em vacuolização do citoplasma e fenômenos de cariólise e cariorrexe. O pigmento nestes casos aparecia reunido em grumos

TABELA 3

Pintos inoculados com *P. gallinaceum*, tratados com quinina e não tratados. Sobrevivência em dias após a inoculação, intensidade da infecção sanguínea e endotelial no dia da morte.

TRATADOS				NÃO TRATADOS			
N.º	SOBREVI- VENCIA (DIAS APOS INOCULAÇÃO)	PARASITOS EM 100 HEMÁCIAS (T)	PARASITOS EM 100 CAPILARES	N.º	SOBREVI- VENCIA (DIAS APOS INOCULAÇÃO)	PARASITOS EM 100 HEMÁCIAS (TE)	PARASITOS EM 100 CAPILARES
102	10	30	92	129	4	129	0
104	10	16	92	131	4	140	0
122	10	22	93	140	4	140	0
89	11	23	69	141	4	109	0
91	11	29	87	144	4	98	0
95	11	19	94	153	4	113	0
109	11	35	92	156	4	102	0
113	11	14	87	162	4	109	0
118	11	15	85	127	5	132	0
87	12	33	92	130	5	182	0
88	12	79	98	132	5	101	0
98	12	21	77	133	5	94	0
115	12	19	89	134	5	137	0
117	12	14	95	135	5	118	0
123	12	15	86	137	5	133	0
85	13	22	91	138	5	120	0
92	13	21	96	139	5	144	0
93	13	21	92	143	5	137	0
96	13	30	92	146	5	110	0
99	13	12	93	147	5	123	0
101	13	9	86	149	5	144	0
105	13	18	92	154	5	137	0
106	13	13	96	155	5	128	0
112	13	16	88	157	5	149	0
121	13	25	89	158	5	108	0
124	13	26	97	160	5	162	0
90	14	19	75	161	5	143	0
107	14	11	60	163	5	129	0
108	14	5	93	164	5	168	0
110	14	11	86	125	6	148	0
114	14	22	96	126	6	165	0
116	14	12	91	128	6	167	0
119	14	18	89	136	6	184	0
120	14	20	61	142	6	121	0
86	15	23	97	145	6	172	0
94	15	19	95	148	6	118	0
97	15	16	99	150	6	104	0
100	15	18	91	151	6	117	0
103	15	18	96	152	6	164	0
111	15	28	98	159	6	122	0

T = trofozoítos. Nestes casos só excepcionalmente foram encontradas outras formas evolutivas.

TE = trofozoítos e outras formas evolutivas (esquizontes e gametócitos).

mais grosseiros do que nas formas normais. A partir do 7.º dia, na maioria das aves tratadas, e pouco depois nas restantes, o número de parasitos começou a incrementar paulatinamente, apesar da terapêutica. Neste período os plasmódios eram representados exclusivamente por trofozoítos, sendo excepcional o encontro de formas mais evoluídas. Ao fim de poucos dias eram encontrados, em muitos casos, mais de 20 % de trofozoítos, sobrevivendo a morte de todos os animais entre o 10.º e o 15.º dias da infecção. A contagem de parasitos, feita no dia da morte, revelou números às vezes elevados, até cerca de 30 % (fig. 4).

Pelo exame da tabela 3, vê-se que os animais não tratados morreram todos na época em que a infecção sanguínea atingiu grave intensidade. O mesmo não ocorreu com as aves tratadas porque a ação medicamentosa impediu a multiplicação dos parasitos nas hemácias.

Sabendo-se que as formas eritrocitárias são vulneráveis quando atacadas pela quinina, fica assim explicado o fato de quase não serem encontrados parasitos pigmentados nas hemácias dos animais submetidos ao tratamento.

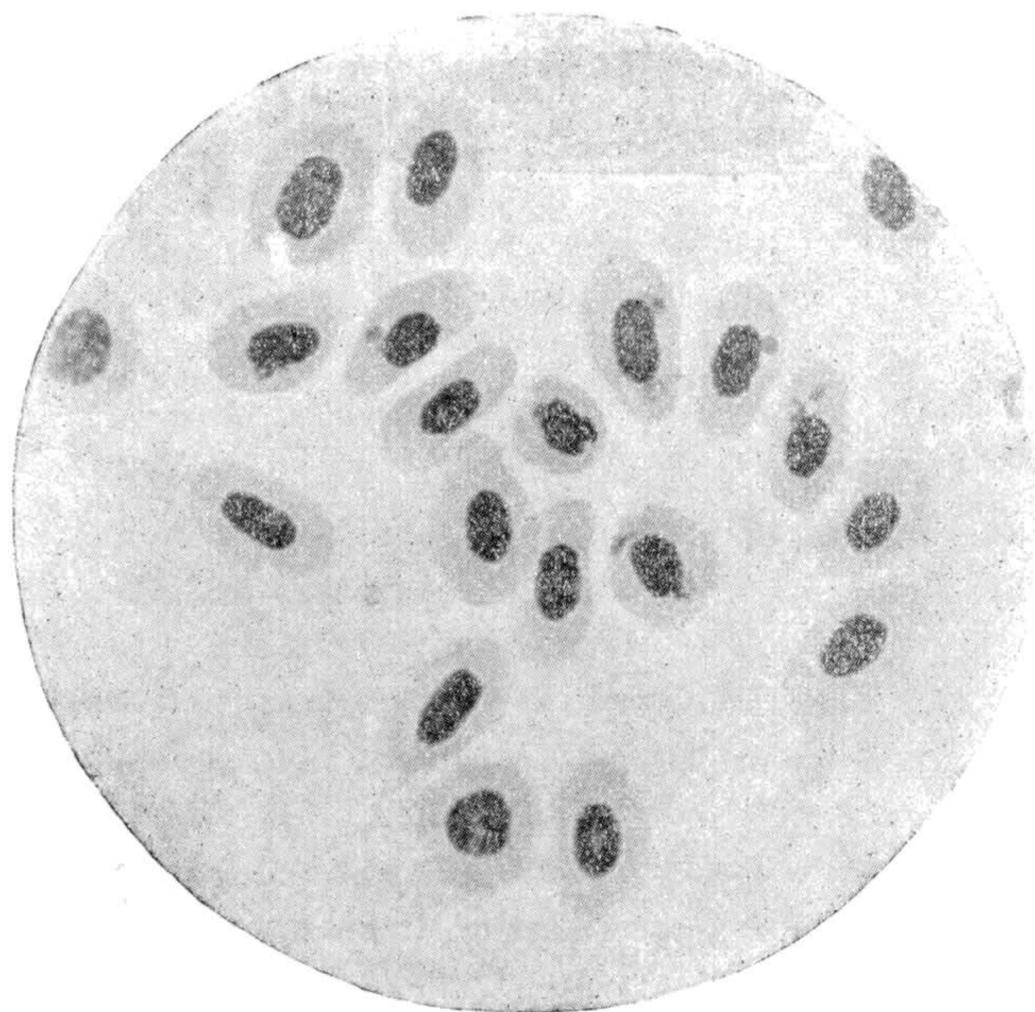


Fig. 4 — *P. gallinaceum*. Trofozoítos nas hemácias, em um caso tratado pela quinina. São vistos 9 parasitos em 18 glóbulos. x 1.200. — Foto J. Fontes.

Para se formar o pigmento é necessário que o parasito metabolize a hemoglobina, e esta ação só é exercida pelas formas em crescimento (estádios pos-

teriores a trofozoítos), que mal chegavam a aparecer porque a isso se opunha a atividade medicamentosa.

Mas se a quinina ataca as formas eritrocitárias, como explicar a presença de trofozoítos nas hemácias em número sempre crescente? Os trofozoítos derivam de duas fontes: dos merozoítos originados pela esquizogonia dos parasitos eritrocitários e dos merozoítos resultantes da esquizogonia das formas exo. Está visto que o medicamento impediu a formação dos merozoítos eritrocitários. Portanto, os trofozoítos encontrados nas hemácias só poderiam resultar das formas exo.

Realmente, o exame dos preparados do sistema nervoso central das aves tratadas revelou a existência de formas exo em tal abundância, que poucos trechos de capilares escapavam ao parasitismo. Por outro lado, nos animais de contrôle as formas exo não foram encontradas. Lembrando aquilo que ficou dito a respeito do aparecimento tardio do ciclo exo nos casos inoculados com sangue, veremos que nesta experiência os animais testemunhos não desenvolveram o ciclo exo porque morreram vítimas da infecção sanguínea aguda. Ao passo que os animais tratados viveram o tempo necessário para que o referido ciclo pudesse aparecer e atingir o apogeu da sua curva de crescimento.

Esta afirmativa é plenamente confirmada em outra experiência, descrita a seguir. Aqui foi utilizada para inoculação uma dose muito pequena de parasitos. É oportuno historiar sumariamente a infecção da ave doadora. Esta havia sido inoculada por via intravenosa aos 20 dias de idade, 5 meses antes, com sangue de outra ave portadora de poucos parasitos nas hemácias (infecção latente). No dia seguinte à inoculação foi iniciado o tratamento pela quinina, o qual foi prolongado durante 26 dias. No decurso do tratamento foram feitos exames de sangue em dias alternados, e somente três vezes foram encontrados raríssimos trofozoítos nas hemácias, respectivamente no 7.º, 21.º e 24.º dias após a inoculação (0.1, 0.1 e 0.05 %). Suspenso o tratamento, a infecção sanguínea aumentou um pouco e depois tornou-se crônica. Decorridos 5 meses após a inoculação, a pesquisa de parasitos no sangue (1.000 campos, cêrca de 100.000 hemácias) deu resultado negativo. Nesse momento foi feita a contagem do número de glóbulos vermelhos (2.780.000 por mm<sup>3</sup>). Com êste sangue foram então inoculados, por via intravenosa, 30 pintos Light Sussex de 5 dias, cada animal recebendo  $\frac{1}{10}$  cm<sup>3</sup> de material infectante. Supondo que existisse 1 parasito em cada 100.000 hemácias da ave doadora, teriam sido inoculados em cada pinto apenas 2.780 parasitos.

Os animais foram separados em dois grupos de 15 aves (tratadas com quinina e não tratadas). Três dias após a inoculação foram sacrificados 3

TABELA 4

Evolução da infecção sanguínea e intensidade da infecção endotelial no dia da morte, em pintos inoculados com *P. gallinaceum* (pequena dose de parasitos), tratados com quinina e não tratados

TRATADOS													NÃO TRATADOS														
N.º	PARASITOS EM 100 HEMÁCIAS												PARASITOS EM 100 CAPILARES NO DIA DA MORTE	N.º	PARASITOS EM 100 HEMÁCIAS												PARASITOS EM 100 CAPILARES NO DIA DA MORTE
	Dias após inoculação														Dias após inoculação												
	4	6	8	10	12	14	17	18	19	20	21	24			4	6	8	10	12	14	17	19	21	22	23	24	
497	0.02	0.01	0.01	0.05	T 0.01	0.03	2	8+					54	502	0.01	0.46	27	79+							0		
498	0.02	0.02	0	0.06	T 0.12	0.02	1	9+					90	504	0.01	0.26	17	70+							0		
491	0	0.02	0.16	0.13	T 0.23	0.13	0.44	—	9	13+			91	511	0.01	0.75	16	61	72	102	103	74	+		94		
492	0	0.01	1.40	0.03	T 0.12	0.10	0.15	—	7	+			89	512	0	0.02	2	87	58	76	54	62	+		93		
493	0	0.03	0.10	0.06	T 0.19	0.12	0.22	—	6	+			93	514	0.01	0.32	13	112	30	50	27	12	32+		98		
494	0.01	0.03	0.02	0.01	T 0.21	0.03	0.30	—	9	+			94	503	0.01	0.14	21	97	21	12	T 11	9	5	+	95		
495	0	0.32	2.15	0.32	T 0.20	1.30	0.40	—	9	+			92	505	0	0.01	0.53	58	48	25	21	T 18	30	+	92		
496	0	0.43	0.30	0	T 0.15	0.08	0.05	—	3	+			91	507	0	0.01	4	89	30	12	T 9	5	7	+	97		
500	0.06	0	0	0.02	T 0.06	0.02	0.30	—	11	+			99	509	0	0.02	0.20	20	79	19	T 8	4	16	+	99		
501	0	0.31	0.06	0.01	T 0.17	0.50	1.30	—	15	+			95	513	0.01	0.23	21	112	38	91	84	51	58	+	95		
489	0.01	0.03	0	0.01	T 0.05	0	0.12	—	0.50	—	15+		94	515	0.01	0.30	8	57	111	85	95	39	29	+	98		
487	0.02	0.04	0.01	0.01	T 0.04	0.01	0.01	—	0	—	0.04	0.06	— §	516	0	0.13	29	52	11	54	20	18	T 30	+	94		
490	0	0.38	0.28	0	T 0.19	0.15	0.10	—	0.60	—	0.07	0	— §	510	0	0.15	26	80	50	24	12	10	T 4	—	+	78	
														508	0	0.27	21	35	6	2	T 2	2	1	—	—	+	59

T indica a data a partir da qual foram encontrados exclusivamente trofozoítos nas hemácias.

§ a infecção tornou-se crônica.

+ indica a data da morte

pintos que apresentavam certa sonolência, suspeitos de moléstia intercorrente, mas o exame necroscópico não revelou anormalidade. Restaram então 27 animais, distribuídos como se vê na tabela 4, onde se encontram os resultados desta experiência.

No 3.º dia após a inoculação foi examinado o sangue de tôdas as aves, com resultado negativo. No 4.º dia apareceram os primeiros plasmódios nas hemácias de 13 animais, e no 6.º dia todos os outros estavam positivos.

As aves do lote tratado começaram a receber quinina justamente no dia em que foram identificados os primeiros parasitos no sangue. Dêste lote sobreviveram dois exemplares (ns. 487 e 490), que ainda se acham vivos, com malária crônica, até esta data, transcorridos 66 dias após a inoculação. Nêles a infecção sanguínea foi sempre muito discreta. As aves restantes do lote tratado morreram tôdas entre o 18.º e o 21.º dias da infecção, com os endotélios dos capilares encefálicos bloqueados pelas formas exo, provocando a já descrita invasão do sangue por trofozoítos. Vê-se, portanto, que a infecção nos animais dêste lote comportou-se de modo semelhante à dos animais tratados da experiência anterior. Os dois exemplares que escaparam à morte constituem uma exceção que raramente ocorre, quando se trata de aves muito jovens.

Por outro lado, a infecção dos animais não tratados divergiu profundamente daquilo que se observou no lote testemunho da experiência antes descrita. Com exceção de dois (ns. 502 e 504), que morreram na fase aguda, todos os demais sobreviveram a esta fase para morrerem vários dias depois, quando a infecção se achava em franco declínio ou (o que foi mais comum) quando já tinha sido vencido êsse período de declínio que sucede à fase aguda.

Nas duas aves que morreram no 10.º dia, não foram encontradas formas exo nos endotélios cerebrais. Nas restantes estas formas estavam sempre presentes, em tão grande abundância quanto nos animais tratados. Êste fato é digno de nota, porque confirma o que foi dito anteriormente: as formas exo pouco aparecem nas infecções agudas porque os animais morrem antes que essas formas possam desenvolver-se plenamente. Nesta experiência, a resistência oferecida pelas aves à infecção aguda permitiu que elas vivessem o tempo necessário ao desenvolvimento do ciclo exo, como acontece quando é feito o tratamento pela quinina.

Resta ainda examinar outro fato observado nos animais dêste grupo que ultrapassaram o período agudo da infecção.

O *P. gallinaceum*, evoluindo nas hemácias, provoca a morte do organismo hospedeiro com tanto maior freqüência quanto menor é a idade do

animal. O incremento do parasitismo sanguíneo é rápido, e em poucos dias a infecção das hemácias atinge níveis elevados, ocasionando a morte nas aves muito jovens. Além deste período agudo, é excepcional a sobrevivência de pintos inoculados dentro dos primeiros 10 dias de vida.

Nas aves mais velhas, entretanto, é comum observar-se, no ápice desta fase aguda, uma queda brusca da curva parasitária, correspondendo à denominada crise. Este fenômeno é acompanhado pelo derrame em circulação de eritroblastos em quantidade freqüentemente elevada. Decaído o número de parasitos nos glóbulos vermelhos, a infecção sanguínea entra na fase crônica. Esta se prolonga pelo resto da vida do animal, e durante ela são encontrados plasmódios no sangue em quantidade muito reduzida. Mesmo quando ao exame direto não aparecem hemácias parasitadas, a inoculação de sangue em ave suscetível provoca a malária, comprovando a existência de infecção latente.

Durante toda a infecção, e principalmente a partir do período de crise, observam-se fenômenos que permitem acreditar no desenvolvimento de processos imunitários. Um destes fenômenos é a fagocitose precoce e cada vez mais intensiva de parasitos, exercida tanto pelos leucócitos como pelas células do SRE. Outro é o aparecimento de plasmódios degenerados, fazendo crer na formação de anticorpos parasiticidas. Além disso observa-se retardação do crescimento dos parasitos, alteração do sincronismo, etc.

Analisando o comportamento dos animais não tratados desta experiência, que resistiram à fase aguda, penso poder explicá-lo da seguinte maneira: A inoculação intravenosa de pequeno número de parasitos provocou uma infecção com período prepatente relativamente longo, a qual progrediu com lentidão para o ápice de sua curva. Quando o vértice foi atingido, já se havia movimentado com eficiência o mecanismo imunitário. Isto não acontece quando se inocula elevado número de parasitos, de modo a provocar infecções de rápido incremento. Dada a baixa idade dos animais, que os torna altamente suscetíveis ao desenvolvimento das formas exo, não pode ser mantido esse estado de imunidade adquirida que caracteriza as maiores idades. O ciclo exo evoluiu, lançando à circulação os seus elementos maduros e provocando assim o aparecimento de trofozoítos nas hemácias, nas mesmas condições observadas nos animais tratados.

E' interessante notar como, nesta experiência, a imunidade adquirida pelas aves à custa da infecção aguda funcionou de modo equivalente à ação da quinina no grupo tratado. A observação do gráfico 1 mostra claramente que, depois de ultrapassada a crise, os parasitos passaram a ser representados cada vez mais exclusivamente por trofozoítos, e em muitos casos somente

êstes eram presentes. Isto parece ser uma prova muito nítida da ação de anticorpos parasiticidas. Por outro lado cabe notar que, apesar desta evidente ação antiparasitária, a invasão das hemácias pelos trofozoítos oriundos do ciclo exo continuou em progressão crescente. Esta constatação sugere a idéia de que os processos imunitários na malária são estimulados apenas pelos parasitos das hemácias, não cabendo às formas exo qualquer papel neste sentido. Sabe-se que a diferença essencial entre as infecções provocadas pelos plasmodídeos e pelos hemoproteídeos é a ausência, nestes últimos, da esquizogonia eritrocitária. É para o *Haemoproteus columbae* os trabalhos de Sergent & Béquet (1914) estabeleceram a ausência de imunidade, inclusive para amostra homóloga.

### ORIGEM DOS TROFOZOÍTOS DAS HEMÁCIAS NAS INFECÇÕES TRATADAS

Algumas espécies de plasmódios são dotadas de acentuado tropismo para certas vísceras, em cuja intimidade realizam o seu desenvolvimento esquizogônico eritrocitário. Isto se verifica no *P. falciparum*, sendo um fato sobejamente conhecido. O mesmo observou Raffaele (1934) no *P. elongatum*. Esta ligeira digressão é feita a propósito dos resultados das experiências que acabam de ser descritas. De fato, poderia parecer àqueles que não tiveram oportunidade de lidar com o *P. gallinaceum*, que nos casos referidos a esquizogonia eritrocitária se estivesse realizando na profundidade das vísceras. Tanto mais quanto, nas espécies que possuem essa peculiaridade, as formas existentes na circulação periférica são trofozoítos e gametócitos maduros. No entanto, a esquizogonia eritrocitária do *P. gallinaceum* realiza-se indiferentemente no sangue periférico ou visceral. A contagem de parasitos nos preparados de sangue e de órgãos, feitos na mesma ocasião, dá resultados praticamente equivalentes.

Para tentar uma demonstração cabal de que os trofozoítos aparecidos em quantidade crescente nas hemácias são derivados das esquizogonias exo, foram feitas observações especiais em um grupo de aves tratadas pela quinina, segundo os moldes das experiências anteriores. Nestes animais, em número de 10, foram pesquisadas simultaneamente as formas eritrocitárias e as formas exo, em intervalos aproximadamente regulares, durante a vida.

A pesquisa das formas exo no animal vivo é feita com facilidade pelo processo descrito no trabalho de Coggeshall, Porter & Laird (1944), que consiste na punção craniana para retirada de um pequeno fragmento de substância cerebral. Realiza-se assim uma autêntica biópsia, que pode ser repetida várias

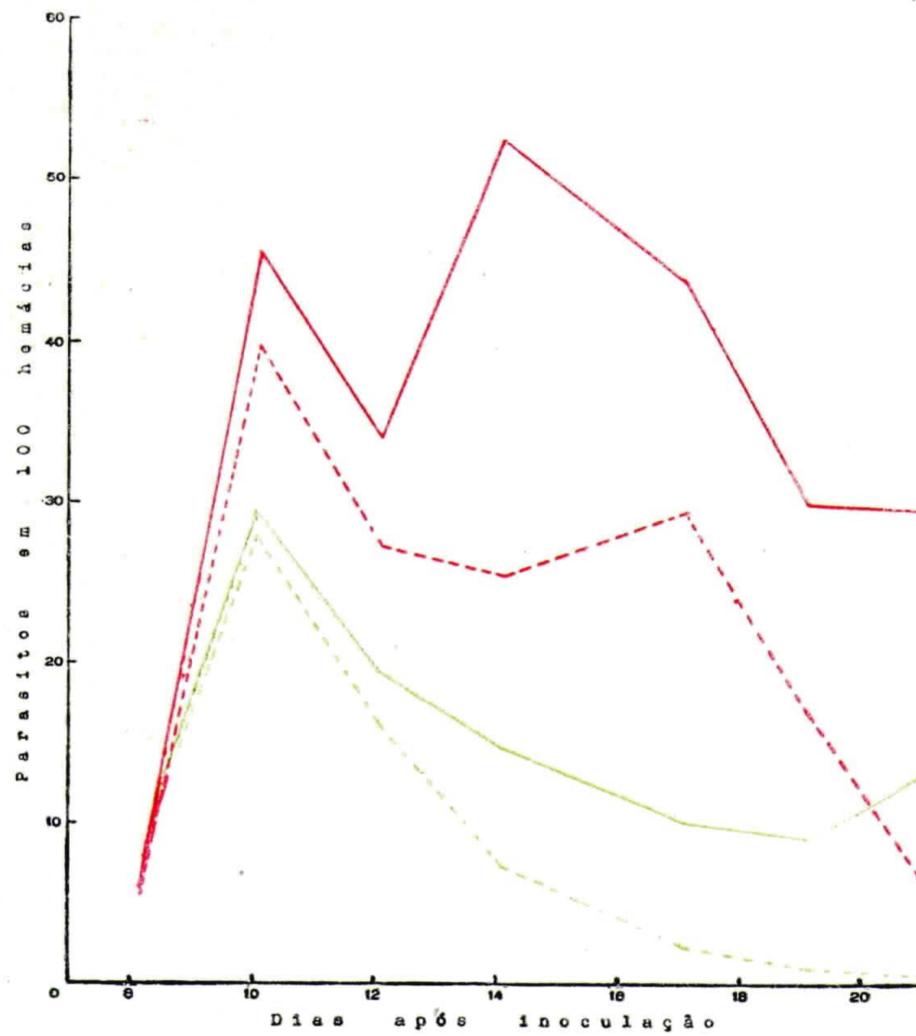


Gráfico 1 — Evolução da infecção sanguínea das aves não tratadas da tabela 4, com exclusão de 502 e 504. As linhas cheias indicam as curvas de trofozoítos e as linhas interrompidas correspondem às curvas de esquizontes.

Médias das curvas individuais das aves ns. 511, 512, 513, 514 e 515:

— trofozoítos em 100 hemácias,  
 - - - esquizontes em 100 hemácias.

Médias das curvas individuais das aves ns. 503, 505, 507, 508, 509, 510 e 516:

— trofozoítos em 100 hemácias,  
 - - - esquizontes em 100 hemácias.

vêzes no mesmo animal, ocasionando poucos contratemplos. A técnica é muito simples. O material consta de seringas de  $\frac{1}{4}$  cm<sup>3</sup>, munidas de agulhas finas e curtas. A agulha, adaptada a uma seringa contendo 0,02 de solução fisiológica, é introduzida no córtex cerebral e imediatamente comunica-se-lhe um movimento rotatório de 360°, efetuando-se ao mesmo tempo ligeira sucção. Retira-se a agulha, cuja luz deve então conter pequeno fragmento de tecido cerebral, com o qual é feito um esfregaço. Este é fixado com álcool metílico e corado pelo Giemsa.

Em geral, o comportamento da ave não se modifica após a punção. Em alguns casos esta é seguida imediatamente de fenômenos convulsivos, que duram alguns segundos apenas. Depois das convulsões o animal levanta-se e volta logo à postura normal, podendo entretanto, algumas vêzes, perma-

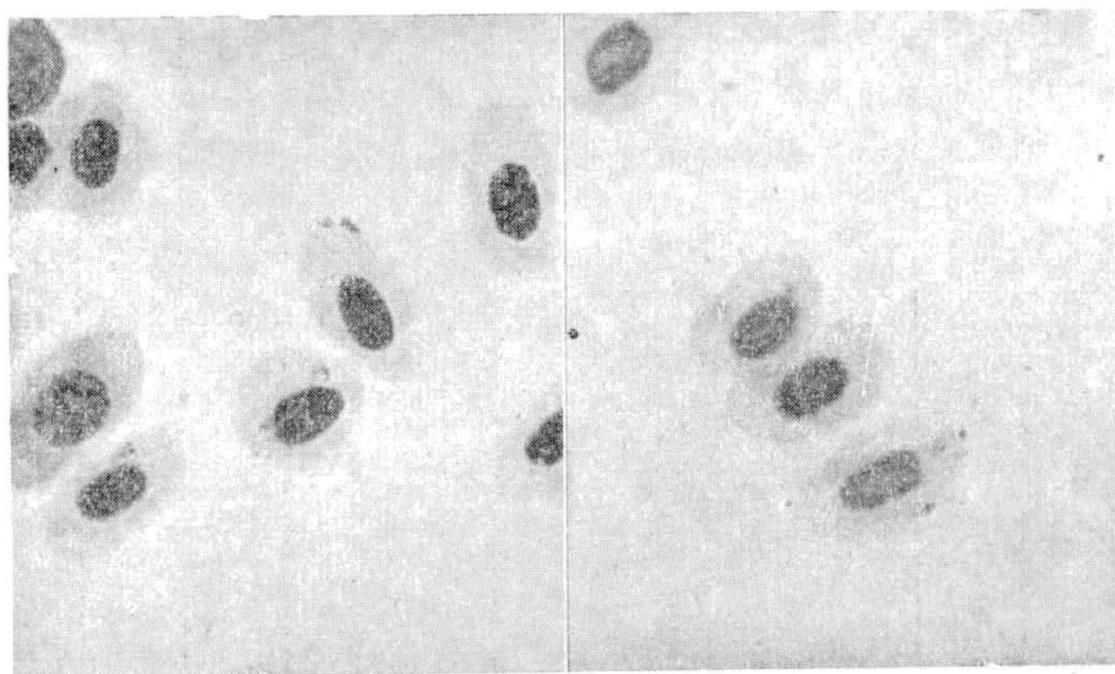


Fig. 5 — *P. gallinaceum*. Trofozoítos nas hemácias, em um caso tratado pela quinina. Comparar as formas em anel e ferradura com os elementos semelhantes encontrados nas figs. 6 e 7. x 1.200. — Foto J. Fontes.

necer vários minutos em estado comatoso, do qual em seguida se refaz. Nos casos em que a punção provoca a morte, esta pode ser imediata, durante o desencadeamento da crise convulsiva, ou pode sobrevir depois de passar o animal por um período de coma de alguns minutos. Apenas duas vêzes em cerca de 300 punções ocorreu tardiamente a morte, algumas horas depois. Nestes casos os animais não apresentaram transtôrno imediatamente após a intervenção e morreram horas depois, no decurso de súbita crise convulsiva,

em consequência de copiosa hemorragia intracraniana. Na experiência que está sendo descrita, somente uma ave (n. 200) morreu em consequência da punção.

Os resultados desta experiência estão reunidos na tabela 5. Observa-se que existe nítida relação de paralelismo entre o número de trofozoítos presentes nas hemácias e a intensidade da infecção do encéfalo pelas formas exo.

TABELA 5

Evolução da infecção pelo *P. gallinaceum*, tratada com quinina, observada simultaneamente nas hemácias do sangue periférico e nos endotélios cerebrais.

N.º	PARASITOS EM 10 <sup>6</sup> HEMÁCIAS								PARASITOS EM 100 CAPILARES					
	Dias após inoculação								Dias após inoculação					
	2	4	7	9	10	11	12	13	7	9	10	11	12	13
200	0.84	3.80	5.8+						0§					
197	0.53	0.35	T 0.84	0.96	1	29+			0	6	35	87+		
199	3.57	0.77	T 1.20	9.50	46	59+			0	9	78	95+		
195	0.53	0.38	T 1	0.40	0.30	5	24+		0	3	8	40	91+	
196	0.45	0.67	T 1.05	15	69	83	88+		0	5	42	82	97+	
202	0.43	0.60	T 1	1	0.15	18	23+		0	0	8	70	73+	
198	0.64	0.27	T 0.10	1.80	7	12	12	23+	0	1	24	63	87	91+
201	0.49	T 0.20	0.64	0.70	2	4	18	33+	0	0	4	23	47	92+
203	0.63	0.42	1.50	0.43	1 0.45	2	4	9+	0	0	3	25	68	93+
204	0.89	0.08	T 2	1.75	0.50	2.40	5	18+	0	0	2	7	26	86+

+ Indica a data da morte.

§ Morreu em consequência da punção.

T indica a data a partir da qual foram encontrados exclusivamente trofozoítos nas hemácias.

De fato, no primeiro dia em que os animais foram puncionados, havia em todos um número muito baixo de hemácias parasitadas por trofozoítos, ao mesmo tempo que as formas exo não eram ainda encontradas. Daí em diante o número de trofozoítos aumentou sempre, de maneira bem acentuada, atingindo grande concentração à medida que se avizinhava a morte do hospedeiro.

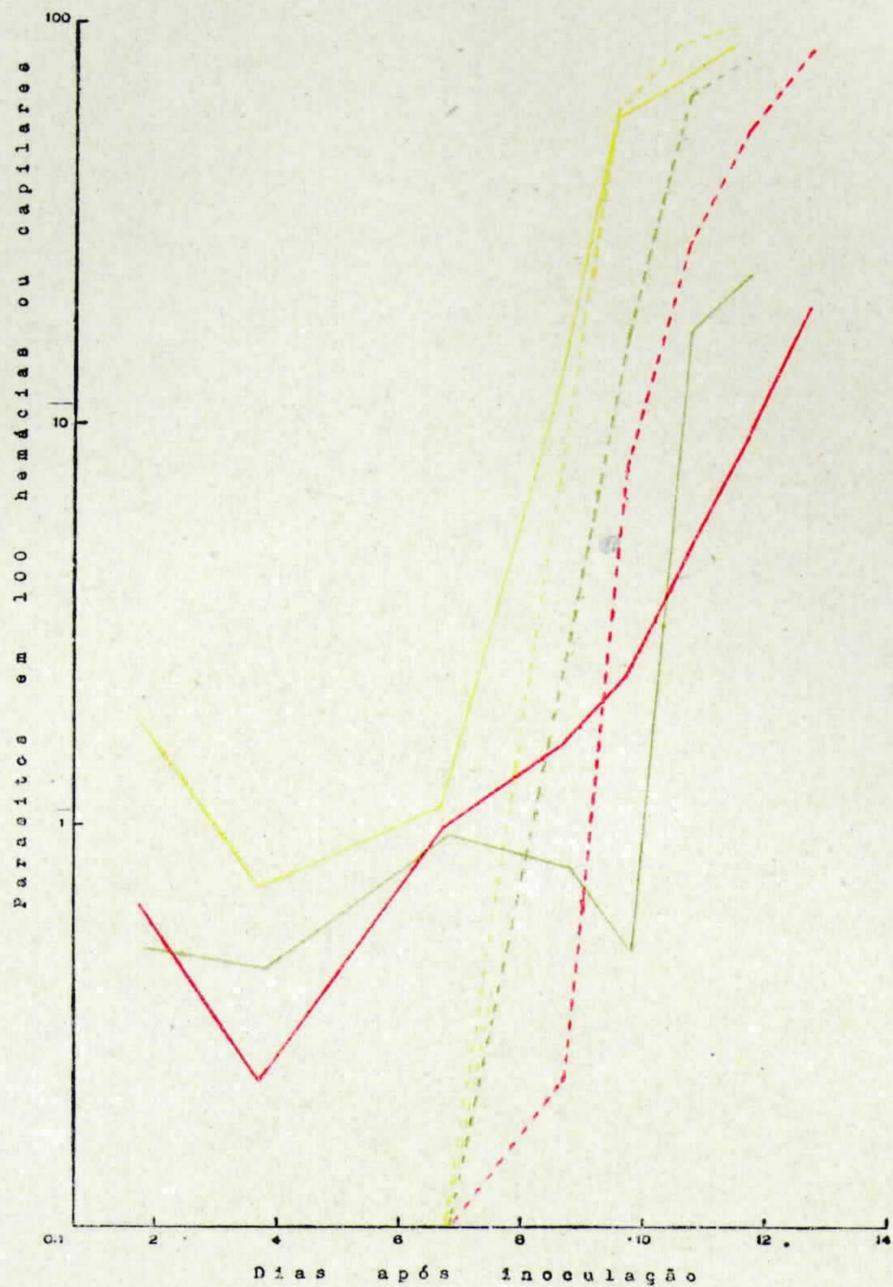


Gráfico 2 — Evolução das infecções sanguínea e endotelial das aves da tabela 5, com exclusão de n. 200. As linhas cheias indicam as curvas de parasitos sanguíneos e as linhas interrompidas correspondem às curvas de formas exo nos endotélis dos capilares cerebrais.

Médias das curvas individuais das aves ns. 198, 201, 203 e 204:

— parasitos em 100 hemácias,  
 - - - parasitos em 100 capilares.

Médias das curvas individuais das aves ns. 195, 197 e 202:

— parasitos em 100 hemácias,  
 - - - parasitos em 100 capilares.

Médias das curvas individuais das aves ns. 196 e 199:

— parasitos em 100 hemácias,  
 - - - parasitos em 100 capilares.

deiro. O mesmo ocorreu em relação às formas exo, de modo que no dia da morte a infecção dos endotélios era maciça.

Este paralelismo é muito bem evidenciado pela representação gráfica. Com os dados da tabela 5 foi construído o gráfico 2, cuja leitura é bastante sugestiva.

As marchas das infecções sanguínea e endotelial acham-se expressas em forma semilogarítmica. As ordenadas logarítmicas foram utilizadas para facilitar o registro dos valores muito baixos, inferiores à unidade, encontrados sucessivamente nos primeiros dias da infecção sanguínea. Estes valores aparecem quando a procura de glóbulos infectados se estende a 10.000 elementos. Na contagem de capilares parasitados, em material obtido por punção, ao contrário, nunca foram obtidos resultados inferiores à unidade. Isto porque o número de segmentos de capilares encontrado nos preparados desse material é sempre menor que 100. Para ter uma idéia do número de fragmentos vas-

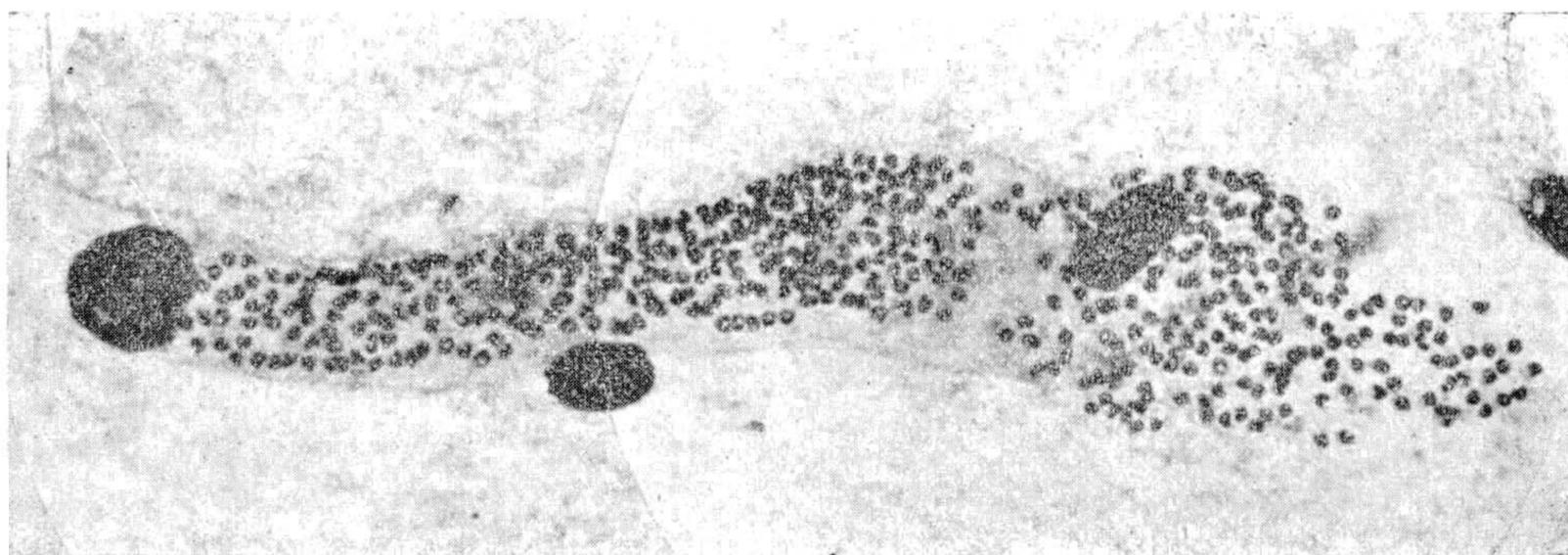


Fig. 6 — *P. gallinaceum*. Formas exo no endotélio de um capilar cerebral. Os merozoítos estão aptos a infectar as hemácias (vêr fig. 5). Caso tratado pela quinina. x 1.200. — Foto J. Fontes.

culares conseguidos em cada biópsia, registrei a sua freqüência em 300 punções, obtendo a média de 53, com valores extremos de 20 e 95.

Da série utilizada nesta pesquisa foi retirada a ave n. 200, que morreu em consequência da punção craniana. As nove restantes foram reunidas, para a confecção do diagrama, em três grupos, tendo em vista a semelhança das respectivas curvas de infecção. O traçado de cada grupo corresponde à média das curvas individuais.

E' interessante observar que a absoluta ausência de ação da quinina sobre as formas exo faz com que a curva de crescimento destas seja regular e rapidamente ascendente desde o início. Ao passo que a eficácia do medica-

mento sôbre as formas eritrocitárias reflete-se na curva inicialmente vacilante que daí resulta. Pouco depois, entretanto, o crescimento da população parasitária no sangue marcha paralelo ao dos elementos exo. Isto não é devido à incapacidade terapêutica da quinina sôbre as formas eritrocitárias, visto como estas continuam a ser destruídas na fase adventícia de trofozoíto. E' devido à descarga irrefreável, na circulação, d'esses trofozoítos oriundos do retículo-endotélio.

Para reforçar a idéia de que as formas encontradas nos glóbulos vermelhos, nos casos tratados, são resultantes dos merozoítos exo, concorre, além

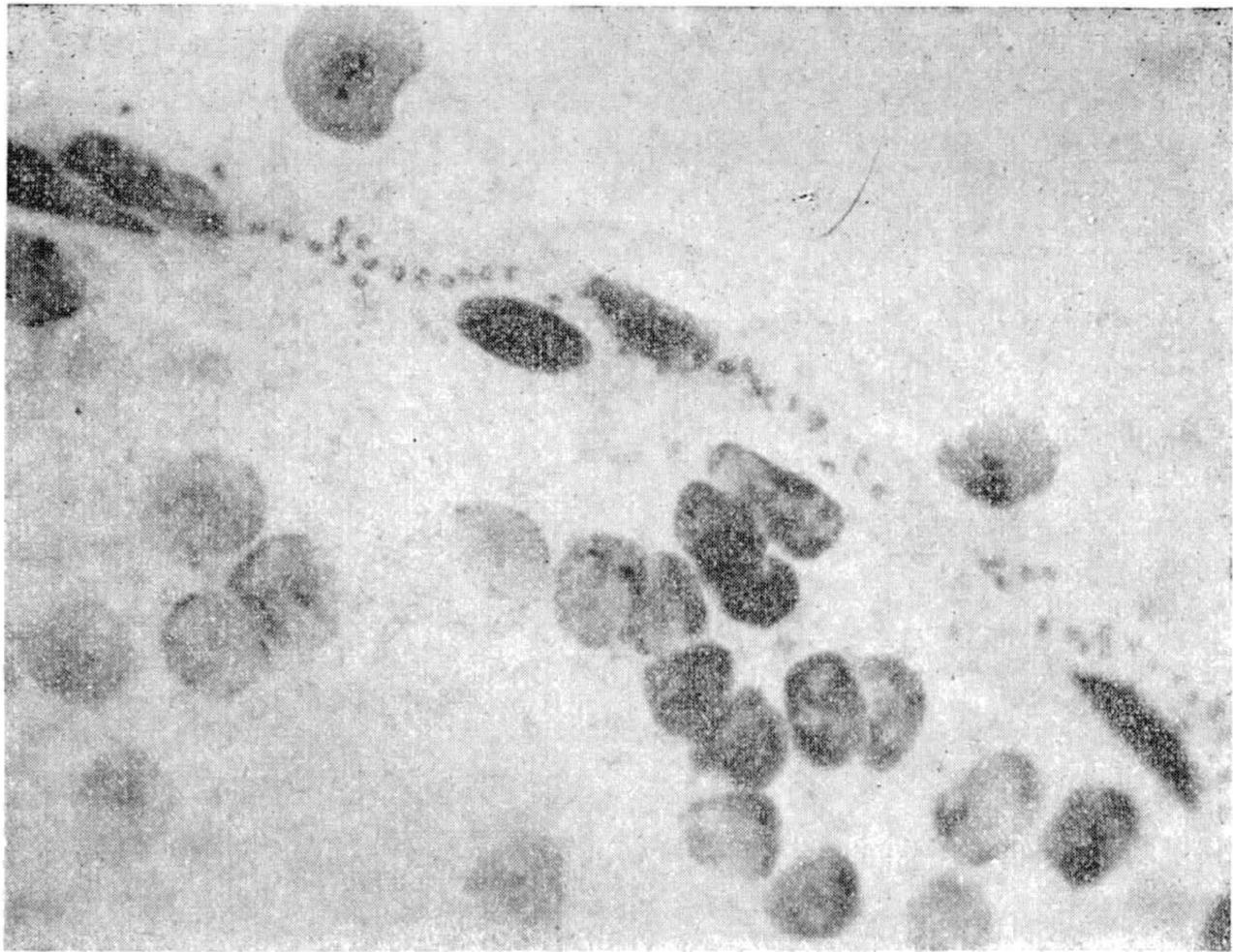


Fig. 7 — *P. gallinaceum*. Formas exo no endotélio de um capilar cerebral. Merozoítos maduros encontrados em um caso tratado pela quinina. Comparar com as formas eritrocitárias jôvens da fig. 5. X 1.200. — Foto Miguel Cesar.

dos fatos referidos, a absoluta semelhança morfológica existente entre os merozoítos exo maduros e os trofozoítos das hemácias. Esta semelhança acha-se ilustrada nas figs. 5 a 7, e mais sugestivamente na estampa 2.

Nas experiências até aqui referidas, como em tôdas as outras em que é adotada a terapêutica pela quinina, observa-se que os animais inoculados em baixas idades (dentro dos cinco primeiros dias de vida) excepcionalmente escapam à morte. Mesmo assim continuam portadores de malária crônica

para o resto da vida. Êstes fatos fazem lembrar aquilo que na malária humana é denominado "quinino-resistência". Trata-se evidentemente de resistência à ação da quinina, mas não no sentido que dão os malariologistas a esta expressão. Os parasitos quinino-resistentes são as formas exo e nunca os parasitos das hemácias. A existência do ciclo exo nos plasmódios humanos é fato ainda discutido, pois as raras constatações até hoje feitas não lograram convencer a grande maioria dos interessados. Mas certamente chegará o dia em que comprovações indiscutíveis serão feitas, e então o problema da quinino-resistência deverá ser resolvido segundo os ensinamentos da doutrina exoeritrocitária.

Ainda como parte dêste capítulo sôbre a origem dos trofozoítos das hemácias na ausência de multiplicação das formas eritrocitárias, referirei dois casos de recrudescência parasitária, nos quais foi observado nítido paralelismo entre as duas curvas (trofozoítos e formas exo). Trata-se de duas aves (ns. 289 e 290) que, com 38 dias de idade, foram inoculadas por via intravenosa com sangue de outra ave portadora de malária crônica. A infecção sanguínea atingiu rapidamente o ponto culminante, e logo depois sobreveio a crise, instalando-se a fase de latência. Esta última durou cêrca de 20 dias em ambos os animais, e durante êsse praso foram encontrados raros parasitos nas hemácias. Depois o número dêstes parasitos começou a subir, à custa de trofozoítos, constatando-se pela punção craniana a infecção dos endotélios cerebrais. Poucos dias após esta constatação as aves morreram com grande número de trofozoítos nas hemácias e com infecção endotelial maciça.

Êstes dois casos não foram submetidos a tratamento, mas isto não impede a sua inclusão neste capítulo. O seu interesse está em demonstrar, mais uma vez, que a invasão do sangue por trofozoítos reflete a pululação das formas exo no SRE. Além disso, êles revelam um aspecto mal estudado da questão do ressurgimento dos parasitos no sangue após um período de latência (recrudescência, recaídas, recorrências).

As recaídas espontâneas na malária *gallinaceum* devem ser pouco frequentes, a julgar pelas poucas referências dos autores e pelas minhas próprias observações. Porisso não é fácil tarefa o estudo sistematizado de casos desta natureza, cujo encontro depende de exames regularmente assíduos em grande número de animais, com pequena probabilidade de êxito.

Sem pretender generalizar e limitando-me à análise dos dois casos observados, julgo interessante assinalar a ausência de multiplicação das formas

eritrocitárias na fase de recrudescência. Cabem aqui os argumentos feitos a propósito de fenômeno idêntico assinalado após o declínio da infecção, nos animais não tratados, na segunda experiência do capítulo anterior.

### DIFICULDADE DO ESTUDO DA AÇÃO PATOGÊNICA DAS FORMAS EXO

O principal obstáculo ao estudo da ação patogênica das formas exo está no fato de que, na vasta maioria dos casos, quando estas formas são muito numerosas existem também parasitos no sangue, em grande abundância. Nestes casos é impossível discriminar com segurança, entre os sintomas e as alterações que se apresentam, aqueles devidos à ação dos parasitos das hemácias e aqueles porventura causados pelas formas exo.

Desde os trabalhos de James & Tate (1937), Brumpt (1937), Raffaele (1938), Rodhain (1939), Adler & Tchernomoretz (1941) e vários outros autores, sabe-se que os medicamentos classicamente empregados contra a malária (quinina e atebrina) não possuem qualquer ação contra as formas exo. Por outro lado, estas mesmas substâncias têm absoluta eficácia contra as formas eritrocitárias assexuadas. Considerando estas noções, seria de esperar que, utilizando um medicamento ativo contra os parasitos eritrocitários, conseguir-se-ia a destruição destes, tornando-se possível observar os efeitos decorrentes do parasitismo pelas formas exo.

Nas experiências anteriores, entretanto, ficou demonstrado que, apesar da quinização intensiva, não foi possível erradicar os parasitos sanguíneos. Permaneceu sempre um pequeno número de trofozoítos, que aumentava dia a dia, até atingir cifras muitas vezes bastante elevadas. Também ficou visto que o número desses trofozoítos refletia a intensidade da infecção endotelial pelas formas exo.

E' impossível, portanto, cultivar o ciclo exo em estado de absoluta pureza no organismo do hospedeiro, isto é, sem que apareçam vestígios de infecção sanguínea. Resta agora saber se a ação patogênica desenvolvida pelo *P. gallinaceum* nos casos estudados, da qual resulta a morte dos animais, depende da presença continuada dos trofozoítos em número crescente nas hemácias, da multiplicação incontida das formas exo no SRE ou da associação de ambos os fatores. As investigações realizadas em torno desse assunto serão descritas em notas subsequentes.

## 2. PROVA TERAPÊUTICA DA AÇÃO PATOGENICA

As observações feitas no decurso deste trabalho parecem indicar que a infecção endotelial representa o papel mais importante na marcha da malária *gallinaceum* tratada pela quinina. Esta primazia é justificada, à primeira vista, pelo vulto incomparavelmente maior do parasitismo exoeritrocitário e pela ausência de multiplicação dos plasmódios que invadem as hemácias.

Nesta segunda parte procurarei qualificar, baseado na ação da sulfadiazina sobre as formas exo, o papel que estas formas desempenham na evolução da malária em estudo.

A ação das sulfonamidas no paludismo tem sido objeto de investigações nos últimos anos, mas os resultados referidos pelos diferentes autores ainda são discordantes. Não me ocuparei desta questão no presente artigo. Por enquanto direi que sobre o assunto já existem numerosos escritos, nos quais são encaradas as questões da terapêutica e da profilaxia da malária pelas referidas substâncias.

A ação profilática e curativa de certas sulfas, principalmente da sulfadiazina, foi experimentalmente demonstrada por Freire & Paraense, em trabalho publicado em abril de 1944. Em novembro desse mesmo ano apareceram mais duas contribuições ao estudo do assunto, respectivamente de Coggeshall, Porter & Laird e de Coatney & Cooper. Os três trabalhos referidos foram todos realizados com o *P. gallinaceum*, dando resultados sensivelmente homogêneos. Os autores que anteriormente trabalharam no assunto assinalaram resultados controversos, sem apresentarem substrato morfológico nos casos em que a medicação se mostrava clinicamente eficaz. Apenas nos dois primeiros trabalhos, dos três que acabei de citar, ficou esclarecido que o poder profilático das sulfas resulta de sua atividade contra as formas exo. Esta noção é utilizada no presente trabalho para demonstrar a ação patogênica das referidas formas nos casos tratados com quinina.

### 1.<sup>a</sup> EXPERIÊNCIA

Foram inoculados, por via intravenosa, 10 pintos Leghorn com 5 dias de idade (ns. 291 a 300), cada animal recebendo cerca de 500.000 parasitos, provenientes de uma ave portadora de infecção crônica. Transcorridos dois dias após a inoculação, foi iniciado o tratamento pelo cloridrato de quinina, conforme as normas seguidas nos trabalhos anteriores.

Na tabela 6 são encontrados os dados finais desta experiência. A infecção deste lote não foi acompanhada com detalhes, porque a finalidade da pesquisa foi apenas buscar orientação para um trabalho mais minucioso.

TABELA 6

Tempo de sobrevivência em dias após a inoculação e intensidade da infecção sanguínea e endotelial no dia da morte, em pintos inoculados com *P. gallinaceum*, tratados com quinina e com quinina-sulfadiazina.

N.º	TRATAMENTO	DIAS APÓS INOCULAÇÃO	PARASITOS EM 100 HEMÁCIAS	PARASITOS EM 100 CAPILARES
291	Q	17	9 T	94
292	Q	16	10 T	96
293	Q	14	11 T	85
294	Q	16	14 T	99
295	Q	17	28 T	97
296	Q	15	13 T	96
297	Q+S	14*	0	86**
298	Q+S	34	32 TE	94
299	Q+S	32	18 TE	96
300	Q+S	30	23 TE	91

Q = Quinina.

S = Sulfadiazina.

T = Trofozoítos.

E = Esquizontes.

\* = Sacrificado.

\*\* = Formas exo alteradas.

Os pintos ns. 291 a 296 foram tratados exclusivamente com quinina. Quanto à evolução da infecção sanguínea, o comportamento deste grupo não diferiu essencialmente daquilo que foi verificado nas experiências anteriores. A freqüência dos parasitos nos glóbulos vermelhos incrementou nos últimos dias da infecção, à custa do aparecimento de trofozoítos provenientes do retículo-endotélio. E os capilares do sistema nervoso central, no último dia de vida, eram portadores de infecção exo maciça. A morte ocorreu entre o 14º e o 17º dias após a inoculação, durante a vigência do tratamento.

Os animais restantes (ns. 297 a 300) tiveram destino diferente. Foram tratados com quinina como os anteriores, mas a partir do 8º dia da infecção foram submetidos à biópsia de tecido cerebral para pesquisa de formas exo. Quando estas eram encontradas pela primeira vez, iniciava-se o tratamento pela sulfadiazina, por via oral, na dose de 1 mg por grama do corpo do animal, aplicada duas vezes ao dia (às 8 e 20 horas). A quinina continuava a ser administrada em uma dose diária (às 14 horas).

N. 297. Inoculado a 20/9/45. O tratamento com quinina foi iniciado a 22/9, prolongando-se até o dia da morte. Punção craniana a 28/9, negativa para formas exo. Segunda punção a 30/9, positiva. Iniciou-se o tratamento com sulfadiazina a 1/10, prolongando-o durante 4 dias, até 4/10, quando foi interrompido. Neste momento o sangue estava negativo ao exame microscópico. O animal foi sacrificado no dia seguinte, para observação do aspecto das formas exo nos preparados de encéfalo. Estas existiam em grande quantidade, mas achavam-se profundamente alteradas.

Ns. 298 e 299. Inoculados a 20/9/45. Início do tratamento com quinina a 22/9. Punção craniana a 28/9, negativa para formas exo. Segunda punção a 2/10, positiva. No dia seguinte foi iniciado o tratamento pela sulfa, que se prolongou por 7 dias, até 9/10, quando cessou a administração de ambos os medicamentos (sulfa e quinina). Neste dia foi feita punção craniana, sendo encontradas formas exo alteradas. O sangue achava-se então negativo ao exame microscópico, mantendo-se nestas condições até o dia 14/10. Durante esta fase negativa, foi retirado  $\frac{1}{2}$  cm<sup>3</sup> de sangue de cada ave, sendo cada amostra inoculada em um pinto, para controlar a ausência de parasitos sanguíneos. Nos animais inoculados desenvolveram-se infecções mortais, com grande abundância de formas exo.

Uma vez suspenso o tratamento sulfo-quinínico destes pintos ns. 298 e 299, o sangue de ambos continuou a ser examinado diariamente. No dia 15/10 os parasitos reapareceram em quantidade ínfima, incrementando o seu número no decorrer dos dias seguintes. O animal n. 298 morreu no dia 24/10, com 32% de plasmódios nas hemácias. O outro morreu no dia 22/10, com 18% de parasitos sanguíneos. Em ambos havia grande quantidade de formas exo no encéfalo, com estrutura inalterada.

N. 300. Inoculado a 20/9/45. O tratamento pela quinina começou a 22/9. Punção craniana a 28/9, negativa. Segunda a 1/10, positiva. A sulfadiazina foi ministrada a partir de 2/10, sendo o tratamento prolongado durante 8 dias, até 9/10, quando cessou o uso de ambos os medicamentos. Neste dia foi feita punção craniana, sendo encontradas formas exo alteradas. O sangue estava negativo ao exame microscópico, mantendo-se assim até o dia 13/10. Como nos dois casos anteriores, foi feita subinoculação de  $\frac{1}{2}$  cm<sup>3</sup> de sangue em um pinto, o qual apresentou uma infecção pouco intensa que se tornou crônica. No dia 14/10 apareceram raros parasitos no sangue desta ave n. 300. No dia 20/10 o animal morreu com 23% de parasitos. No encéfalo existiam formas exo em grande quantidade, com estrutura normal.

Esta experiência tornou possível a observação de alguns fatos interessantes.

É assim que o período de sobrevivência após a inoculação, nos animais tratados com sulfa-quinina, foi duas vezes maior do que naqueles tratados somente com quinina. Nos meus trabalhos anteriores tem sido observado que, nas aves muito jovens, de um lote inoculado ao mesmo tempo e submetido à quinização diária, a mortalidade incide sobre um período limitado a cerca de 4 dias, durante o qual o lote inteiro sucumbe. Na experiência que está sendo analisada isto ocorreu nos 6 animais tratados com quinina, que morreram entre o 14º e o 17º dias da infecção. Se o mesmo não aconteceu com as aves restantes, que formavam com as anteriores um lote homogêneo e inoculado em condições idênticas, foi em consequência da ação da sulfa. Neste grupo, portanto, o ataque às formas exo por meio da sulfa retardou consideravelmente o momento da morte, podendo-se acompanhar em traços gerais o mecanismo desta retardação. De fato, na primeira punção craniana positiva, em cada caso, as formas exo apareceram com aspecto normal, mas depois do tratamento pela sulfa esta morfologia achava-se comprometida à custa de alterações regressivas muito acentuadas. A atividade da quinina sobre o ciclo eritrocitário, por seu lado, impediu o incremento da infecção sanguínea. Assim, ao término de alguns dias de terapêutica associada, o número de parasitos nas hemácias era tão reduzido que a sua presença foi revelada somente pela subinoculação. Se não houvesse destruição das formas exo os trofozoítos surgiriam nas hemácias em quantidades crescentes, como nos animais que só receberam quinina, justamente ao contrário do que foi observado neste grupo tratado com a sulfa.

Suprimida toda a terapêutica, a infecção em cada caso encontrava-se nestas condições: No retículo-endotélio, certo número de formas exo sobreviventes à ação da sulfa; e no sangue, raríssimos trofozoítos derivados daquele resíduo exoeritrocitário. Cada animal achava-se, pois, na situação que ocorre ao fim da incubação da malária provocada por esporozoítos, quando são lançadas ao sangue as primeiras formas eritrocitárias. A partir deste ponto, a infecção progrediu como aconteceria no caso figurado. As formas exo residuais multiplicaram-se intensamente, devendo ser atribuída a este fato a morte dos animais, visto como a infecção sanguínea não atingiu níveis elevados.

Vê-se ainda que, nos casos tratados com a sulfa, mesmo insistindo-se na terapêutica durante um período de 8 dias, não foi possível esterilizar a infecção. Isto parece, até certo ponto, contradizer resultados publicados anteriormente por Freire & Paraense (1944), Coggeshall, Porter & Laird (1944) e Coatney & Cooper (1944). Mas é preciso notar que, nos casos constantes desta experiência, o tratamento pela sulfa só foi iniciado quando já se achava bem instalada a infecção do retículo-endotélio. Parece que a ação

da sulfa é tanto mais eficaz quanto mais precoce fôr o seu emprêgo, explicando-se assim o fato de ser o seu poder profilático mais acentuado que a sua capacidade curativa.

## 2.<sup>a</sup> EXPERIÊNCIA

Esta experiência é uma repetição da anterior, em maior número de animais. Foi inoculado um lote de 50 pintos Light Sussex (10 dias de idade), com alta carga parasitária proveniente de duas aves que apresentavam intensa infecção aguda. Os animais, inoculados por via intravenosa, passaram a constituir três grupos, nas seguintes condições:

Grupo A (10 animais). Cada ave recebeu cêrca de 20.000.000 de parasitos.

Grupo B (25 animais). Cada ave recebeu cêrca de 20.000.000 de parasitos.

Grupo C (15 animais). Cada ave recebeu cêrca de 40.000.000 de parasitos.

### *Grupo A.*

As aves dêste grupo, em número de 10, foram deixadas sem tratamento. Nelas a infecção sanguínea evoluiu de maneira típica, incrementando rapidamente até provocar a morte de tôdas, entre o 3<sup>o</sup> e o 5<sup>o</sup> dias seguintes à inoculação. Como acontece nas aves inoculadas com sangue parasitado que morrem depois de rápida infecção aguda, não foram encontradas formas exo em nenhum dêstes casos.

A inoculação dos animais dêste grupo foi feita apenas com finalidade de contrôle.

### *Grupo B.*

As 25 aves dêste grupo foram tratadas com quinina. A administração do medicamento foi iniciada no dia seguinte à inoculação e mantida até o dia da morte de cada animal. Nos trabalhos anteriores tem sido verificado que, nos 10 primeiros dias do tratamento, o número de plasmódios nas hemácias mantem-se abaixo de 1%. Porisso a procura de parasitos no sangue destas aves só foi iniciada no 12<sup>o</sup> dia da infecção. Nesta data o número de hemácias parasitadas era ainda muito pequeno, sendo poucos os casos em que atingia 1%. No 15<sup>o</sup> dia foram feitas novas contagens, e daí em diante a verificação do número de parasitos em cada caso só foi feita no próprio dia da morte. Os exames não foram repetidos com maior freqüência, para o traçado de uma curva parasitária mais detalhada, por já ter sido êste aspecto estudado no trabalho anterior.

A infecção eritrocitária evoluiu neste grupo de maneira semelhante ao que tenho constatado em experiências anteriores realizadas, nas mesmas condições, em animais tratados com quinina. Tôdas as aves morreram entre o 15º e o 18º dias da infecção, com grande abundância de formas exo no sistema nervoso central. Como sempre tem acontecido nas outras experiências dêste tipo, o sinal de morte próxima foi dado pelo aumento do número de trofozoítos eritrocitários.

Os dados correspondentes a êste grupo constam da tabela 7. A curva da infecção sanguínea está representada no gráfico 3).

TABELA 7

Grupo B. Pintos inoculados com *P. gallinaceum* e tratados com quinina.

N.º	PARASITOS EM 100 HEMÁCIAS					FORMAS EXO EM 100 CA- PILARES NO DIA DA MORTE
	DIAS APÓS INOCULAÇÃO					
	12	15	16	17	18	
580	0.1	5 *				95
566	0.01	0.7	7 *			98
567	0.1	0.8	14 *			97
570	0.1	0.7	18 *			93
571	0.5	1	11 *			83
579	0.7	1	8 *			96
583	0.4	1	12 *			98
586	0.1	1	8 *			78
588	0.04	1	6 *			85
568	0.02	1	4	21 *		50
569	0.01	0.1		8 *		96
573	0.02	0.4		16 *		98
574	0	0.1		16 *		95
575	0.07	0.5		13 *		99
577	0.2	0.5	3	32 *		97
581	0.2	0.8		40 *		98
585	0.1	1		7 *		97
587	0.1	0.1		10 *		94
589	0.5	0.5		8 *		70
590	0.2	0.2		8 *		96
572	0	0.3			10 *	85
576	0.08	0.05			2 *	88
578	0.1	0.2			18 *	99
582	0.2	0.3			14 *	94
584	0.7	0.4		8	12 *	99

\* Dia da morte.

### Grupo C.

Este grupo constava inicialmente de 15 animais (ns. 591 a 605). Transcorridos 18 dias após o início dos trabalhos, foi retirada a ave n. 602, que vinha apresentando intensa anemia fortemente regenerativa, mas não relacionada à malária.

Tôdas as aves dêste grupo, como as do grupo B, foram submetidas ao tratamento quinínico, iniciado no dia seguinte à inoculação. A primeira verificação dos parasitos no sangue foi feita, aqui também, no 12º dia da infecção. O número de plasmódios achava-se então acima de 1%, na grande maioria dos casos. Isto, aliás, era de esperar, por ter sido este grupo inoculado com número duplo de parasitos. Nêste mesmo dia foi iniciado, em tôdas as aves, o tratamento pela sulfadiazina, aplicada em cada animal na dose de 1 mg por grama do corpo. A primeira dose foi ministrada no 12º dia, às 21 horas, seguindo-se as restantes de 12 em 12 horas, até o 17º dia da infecção, quando foram completadas 10 doses para cada indivíduo. Foi então suspensa a administração da sulfa, para ser reiniciada quatro dias depois. Desta segunda vez foram aplicadas apenas quatro doses (21º e 22º dias). Durante todo êsse tempo foi mantida a dose diária de quinina. Esta, por sua vez, foi suprimida no 30º dia da infecção, quando julguei que os animais dêste grupo já tinham sobrevivido aos grupos anteriores por um prazo bastante significativo.

Depois de terminado o segundo tratamento pela sulfa, a curva da infecção eritrocitária revelou acentuada tendência ascendente. No 32º dia as aves ns. 591 e 593 morreram com 28 e 10% de parasitos nas hemácias, respectivamente, sendo êstes valores constituídos quase exclusivamente por trofozoítos. Os capilares encefálicos destas aves estavam intensamente parasitados por esquizontes exo. Êste fato indicava, portanto, que a supressão da terapêutica permitira às formas exo retomarem a sua atividade proliferativa.

A partir dêste momento, os animais foram separados em dois grupos menores, assim constituídos:

Grupo C1: Aves ns. 591-599 (incluindo as duas acima referidas, que morreram no 32º dia).

Grupo C2: Aves ns. 600, 601, 603, 604 e 605.

Os animais do grupo C1 foram postos em observação, a fim de ser acompanhada a marcha ulterior da infecção.

O grupo C2 foi submetido a um terceiro tratamento pela sulfadiazina.

As ocorrências assinaladas para os dois grupos de animais foram as seguintes:

*Grupo C1.* Suprimida a quinina no 30º dia, a infecção sanguínea incrementou rapidamente nas aves ns. 591-594 e 597-599, que morreram entre o 32º e o 38º dias, com abundantes esquizogonias exo. Nestas aves o número de parasitos sanguíneos não atingiu a grandeza observada nas infecções agudas comuns, mantendo-se em tórno de 50%. Entre as formas eritrocitárias predominavam de modo absoluto os trofozoítos, de tal modo que as formas evolutivas mais adiantadas representavam apenas cêrca de 2% dos parasitos encontrados.

Nas aves ns. 595 e 596 a infecção eritrocitária, depois de suspensa a terapêutica, manteve-se durante muitos dias em nível muito baixo, não sendo encontrados mais de 3% de parasitos. Aqui também o número de trofozoítos sobrepujou de maneira absoluta as formas de crescimento, acentuando-se êste predomínio em função do tempo da infecção.

No 47º dia o preparado de sangue da ave n. 596 apresentava 1% das hemácias parasitadas por trofozoítos, sendo encontrado também um volumoso esquizonte exo com 8 núcleos, no mesmo preparado. No 49º dia o número de hemácias parasitadas subiu a 14% (exclusivamente trofozoítos), morrendo a ave nêste dia, com infecção exo maciça.

O último animal dêste grupo (n. 595) morreu no 61º dia da infecção. Aqui também o número de parasitos nas hemácias, que se vinha mantendo durante muitos dias em 1% (trofozoítos), incrementou sensivelmente nos últimos dias atingindo a cifra de 16% por ocasião da morte do animal. Nesta ave foram acompanhadas simultâneamente as marchas das infecções sanguínea e endotelial, nos últimos dias de vida.

Os dados referentes ao grupo C1 estão representados na tabela 8 e no gráfico 4. O gráfico 6 mostra as curvas das infecções sanguínea e endotelial da ave n. 595, nos dias que precederam a morte.

*Grupo C2.* Já foi dito que os animais dêste grupo foram submetidos a um terceiro tratamento pela sulfa. Tendo sido verificada a existência de forte infecção endotelial nas aves 591 e 593, que morreram no 32º dia, era de esperar um incremento das formas exo em todo o lote C. Esta previsão, aliás, foi plenamente confirmada para o grupo C1, como acabamos de verificar.

Sendo, pois, esperado o incremento da infecção endotelial, a aplicação desta terceira série de sulfadiazina foi feita para permitir acompanhar a marcha das alterações provocadas nas formas exo pelo medicamento.



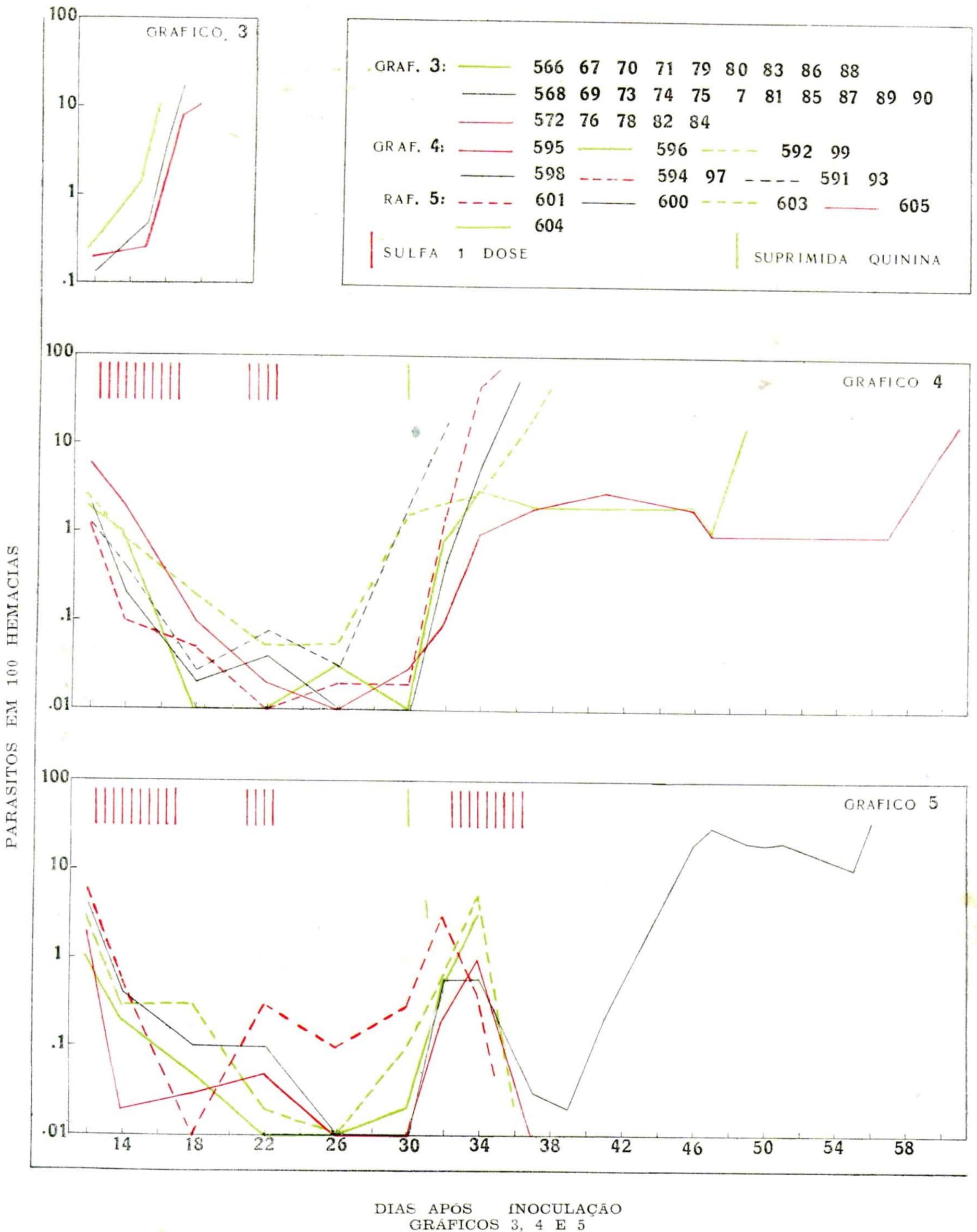


Gráfico 3. Infecção eritrocitária das aves do grupo B, tratadas com quinina até o dia da morte. — Gráfico 4. Infecção eritrocitária das aves do grupo C1, tratadas com quinina e sulfadiazina. — Gráfico 5. Infecção eritrocitária das aves do grupo C2, tratadas com quinina e sulfadiazina; excluindo a ave n.º 600, tôdas as demais foram sacrificadas durante a 3.ª série de sulfa.

O valor zero, encontrado em alguns animais, não significa rigorosamente que o sangue está isento de parasitos, e sim que nenhum destes foi encontrado em 10.000 hemácias examinadas. Por esse motivo, e para simplificar a representação gráfica, os zeros da tabela 8 foram assinalados nos eixos das abscissas, supondo-se assim a existência do número mínimo de parasitos (0.01%).

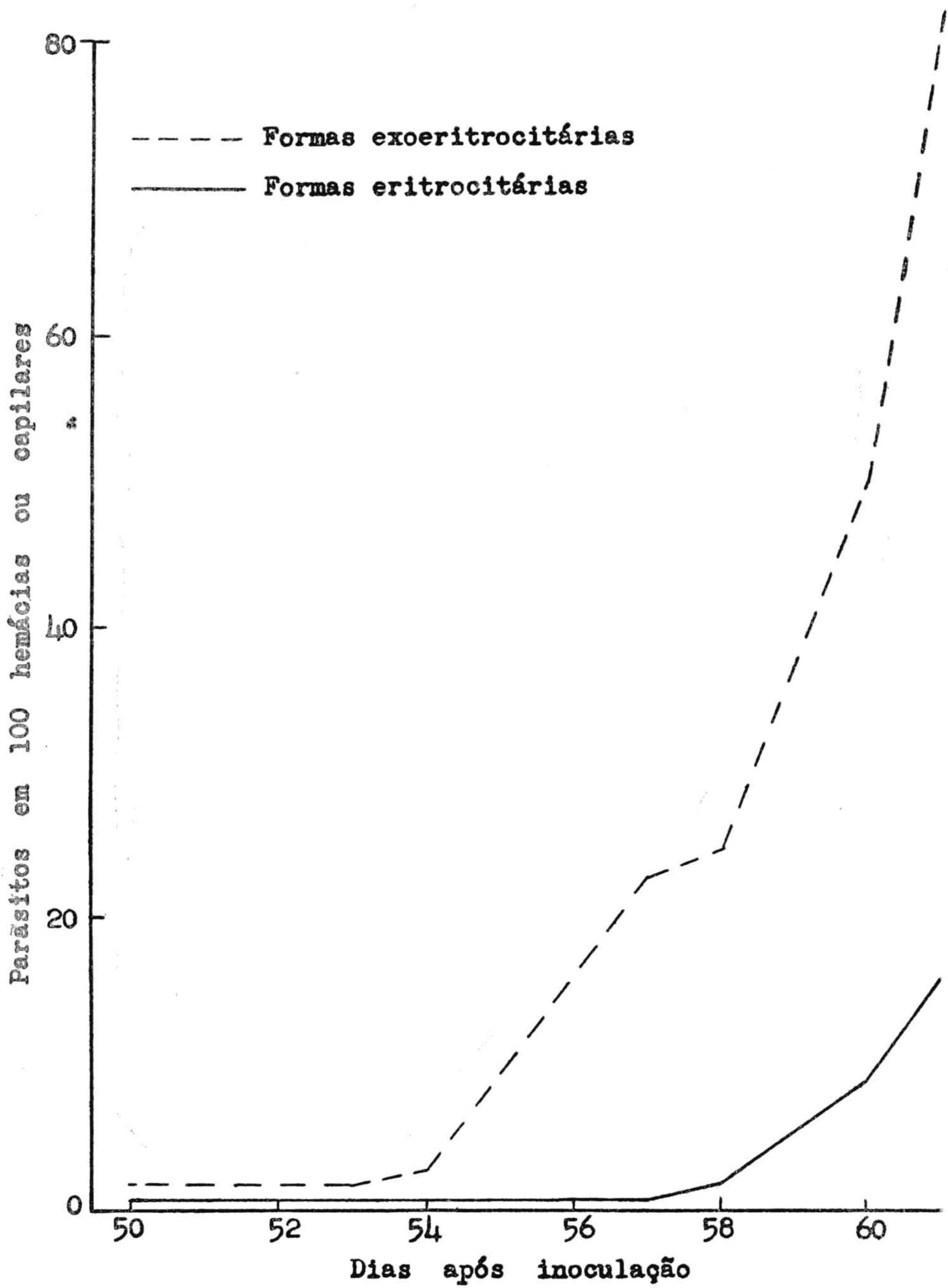


Gráfico 6. Infecções sanguínea e endotelial da ave n. 595 (grupo C1), nos últimos dias de vida.

No 32º dia foi aplicada a primeira dose, às 21 horas, seguindo-se as demais com intervalos de 12 horas. Transcorridas 12 horas após a aplicação da terceira dose, foi sacrificada uma das aves (n. 604), sendo feitos preparados do sistema nervoso central. As aves restantes foram sendo sacrificadas 12 horas depois de ingerirem as seguintes doses respectivas: 5.<sup>a</sup> (n. 601), 7.<sup>a</sup> (n. 603) e 9.<sup>a</sup> (n. 605).

Sobrou a ave n. 600, que não foi sacrificada porque o material obtido, junto com preparados provenientes de trabalhos anteriores, era suficiente para o fim em vista. Esta última ave tomou 9 doses de sulfa, sendo depois submetida à punção craniana. Foram encontradas raras formas exo quase completamente destruídas, sendo então suprimida a terapêutica, no 37º dia. No sangue havia raros parasitos (0.03%), mas o número destes aumentou gradualmente até atingir 30% no 47º dia. Ainda neste caso observou-se predomínio absoluto de trofozoítos. No preparado de sangue do 55º dia foram encontrados 11% de parasitos nas hemácias e também um volumoso esquizonte exo. No 56º dia morreu esta ave, apresentando 36% de formas eritrocitárias, das quais 32% eram trofozoítos. Nos endotélios a infecção era maciça.

Os dados referentes ao grupo C2 são encontrados na tabela 8 e no gráfico 5.

Esta experiência confirmou tôdas as observações feitas na pesquisa anterior.

Uma prova decisiva para a demonstração da ação patogênica das formas exo é, sem dúvida, a sobrevivência dos animais tratados com quinina + sulfa por um período duas vezes maior do que aquele vencido pelos tratados somente com quinina. Esta maior sobrevivência é tanto mais significativa quanto as aves do grupo C foram intencionalmente inoculadas com uma carga parasitária duas vezes maior que aquela recebida pelo grupo B.

Quando se inoculam animais em condições idênticas, variando apenas as doses de parasitos, a velocidade ascensional da curva parasitária variará em função da dose injetada. Mesmo nos casos tratados com quinina, o aumento do número de trofozoítos, que anuncia a proximidade da morte, ocorre com maior antecedência nos animais que recebem maior carga de parasitos. Isto foi observado no grupo C, como se vê comparando os gráficos 3, 4 e 5. Observa-se que, no 12º dia da infecção, correspondente ao 11º dia do tratamento, o teor de parasitos no grupo B estava muito abaixo de 1%, enquanto no grupo C este número já havia sido ultrapassado.

Levando em consideração a experiência acumulada em trabalhos anteriores e o comportamento da infecção nos animais de controle (grupos A e B), é lícito afirmar que a morte das aves do grupo C ocorreria dentro de poucos dias, se não fôsse interrompido o desenvolvimento das formas exo, cuja pululação já se refletia no número de trofozoítos presentes no sangue. Atacadas as formas exo pela sulfa, diminuiu a freqüência dos trofozoítos no sangue, devido ao estancamento da fonte produtora destes parasitos. Uma segunda série de sulfa, constante de 4 aplicações, manteve por mais alguns dias a infecção sanguínea em baixas latitudes. Depois de suspenso o tratamento, reiniciou-se a multiplicação das formas exo, verificando-se em consequência disto nova descarga de trofozoítos e a morte de 7 aves do grupo C1.

A verificação da maior sobrevivência dos animais tratados com a sulfa permite concluir que esta substância age removendo a causa da morte. Por outro lado, a constatação das alterações provocadas sobre as formas exo pelo mesmo medicamento indica a existência de uma relação de identidade entre as referidas formas e a causa de morte.

Dêsse modo, parece-me provado que os animais tratados com quinina morrem em consequência da multiplicação dos esquizontes exo nos endotélios vasculares.

Restam a considerar alguns outros fatos observados durante as experiências que ficaram descritas.

### REATIVAÇÃO DO CICLO EXO DEPOIS DO TRATAMENTO PELA SULFA

Na primeira parte dêste trabalho foi visto que existe uma relação de paralelismo entre as curvas das infecções sanguínea e endotelial, nos casos tratados pela quinina. As numerosas verificações que tenho feito nesse particular permitem considerar aquêle paralelismo como um fenômeno constante, de tal modo que, através das ondulações significativas da curva de trofozoítos eritrocitários, podem-se avaliar as flutuações da produção de esquizontes exo.

Por outro lado, foi visto nesta segunda parte que, quando se tratam as aves com quinina + sulfa, a freqüência dos trofozoítos nas hemácias diminui como reflexo da destruição das formas exo. Esta destruição, nos casos

estudados, não chega entretanto a ser total, de modo que algumas formas escapam à ação do medicamento e depois entram a proliferar mais ou menos rapidamente. Nesses casos ocorre, portanto, uma reativação do ciclo exo, que repercute sobre o sangue por meio do incremento dos trofozoítos.

Se interviermos com a sulfa cada vez que a curva dos trofozoítos atinge um nível não muito alto, obteremos uma linha ondulante cujas flutuações guardam proporção com ondulações correspondentes na linha dos esquizontes exo. Abandonando, porém, a terapêutica, veremos o número de trofozoítos incrementar livremente, em conseqüência da proliferação das formas exo, até que o animal morre com os endotélios bloqueados. Em outras palavras, ocorrerá então a reativação do ciclo exo.

Este fato acha-se, em parte, exemplificado no gráfico 6. Trata-se da ave n. 595 (grupo C1), cuja infecção foi descrita no capítulo referente à segunda experiência. Nesta ave, depois do segundo tratamento pela sulfa, houve aumento do número de trofozoítos, mas a infecção sanguínea manteve-se em baixo nível, apesar da ausência de qualquer terapêutica. O comportamento deste caso era semelhante ao daqueles que tendem à cronicidade, nos quais a imunidade adquirida contrapõe-se ao incremento da infecção sanguínea. Nestes casos, entretanto, o número de plasmódios nas hemácias decresce a valores tão baixos que o parasitismo se torna subpatente. Isto não ocorreu na ave n. 595; e porque nela a infecção se estabilizou em 1%, quase só trofozoítos, foi suspeitada a persistência da esquizogonia exoeritrocitária. Do 50º ao 60º dias foram feitas punções cranianas, podendo-se assim acompanhar a reativação do ciclo exo e o incremento paralelo da infecção sanguínea por trofozoítos (gráfico 6).

O mesmo deve ter ocorrido no caso n. 596, cuja infecção teve um decurso semelhante ao da anterior.

A reativação do ciclo exo nos casos em que a parasitação das hemácias sofre a influência de fatores antagônicos de natureza imunológica, tem como conseqüência o derramamento de trofozoítos no sangue. Nestes casos a infecção comporta-se como naqueles outros tratados pela quinina. A consideração destes fatos leva a crer que a infecção endotelial, pelo menos nos animais muito jovens, não mobiliza o mecanismo imunitário. Pode-se pensar também que a imunidade estimulada pelas formas eritrocitárias não funciona contra os parasitos do ciclo exo. Isto, aliás, já foi objeto de cogitação na primeira parte deste trabalho.

## ALTERAÇÕES DAS FORMAS EXO PROVOCADAS PELA SULFA

As alterações provocadas nas formas exo pela sulfa, que serão descritas a seguir, foram observadas a partir de 12 horas após a aplicação da 3.<sup>a</sup> dose, até 12 horas após a 9.<sup>a</sup> dose. Acham-se em andamento pesquisas dedicadas especialmente a uma verificação mais detalhada dessas alterações, desde o início do tratamento até à completa desaparecimento dos parasitos.

No material colhido após a 3.<sup>a</sup> dose, predominam as formas semelhantes àquela reproduzida na fig. 1 da estampa 3. Os parasitos encontrados são elementos imaturos, dotados de abundante citoplasma basófilo e núcleos relativamente volumosos.

São muito raras as formas maduras, constituídas de pequenas unidades quase exclusivamente reduzidas à cromatina com aspecto de anel ou ferradura, como aquelas figuradas na estampa 2. As que foram encontradas mostram evidentes sinais de desorganização, parecendo que nesta fase os parasitos são mais sensíveis ao medicamento. Entretanto, como o material examinado depois das primeiras doses é ainda insuficiente, não me deterei na consideração destas formas. Possivelmente os elementos maduros são atacados logo de início, ficando poupados aqueles menos evoluídos, os quais só começam a apresentar sinais de alteração depois de sofrerem uma ação medicamentosa mais prolongada.

É assim que, 12 horas após a aplicação da 3.<sup>a</sup> dose, alguns núcleos dos parasitos mostram-se mais intensamente corados que os demais. Isto parece indicar que os núcleos mais corados são a sede de um processo inicial de picnose. Ao lado disto, alguns núcleos apresentam um ponto corado mais intensamente que o resto da sua substância. Em conseqüência, certos esquizontes aparecem pontilhados de grânulos que o Giemsa tingem de vermelho muito escuro. Trata-se de regiões nucleares já em estado de franca picnose.

À medida que aumenta o número ou o tamanho destes grânulos observa-se, nos núcleos não atacados pela picnose, uma diminuição progressiva da sua colorabilidade e da nitidez dos seus contornos. Este aspecto, que predomina nos preparados feitos em seguida à 5.<sup>a</sup> dose, acha-se reproduzido na fig. 2 da estampa 3 e na fig. 1 da estampa 4 (forma à esquerda).

Daí em diante as alterações regressivas definem-se com tãda a clareza na direção dos processos de cariorrexe e cariólise. Observam-se então as etapas representadas nas figs. 3-7 da estampa 3 e nas figs. 1 (forma à direita), 2-4 e 6 da estampa 4.

Finalmente, no material obtido após a 9.<sup>a</sup> dose, a estrutura dos parasitos acha-se quase totalmente apagada. Nesta última fase do processo catabiótico as formas exo estão reduzidas a fina poeira cromatínica dispersa sobre o vestígio azulado do citoplasma, como se vê na fig. 8 da estampa 3 e nas figs. 5 e 7 da estampa 4. Certamente estas formas estão destinadas à fagocitose pelas células endoteliais que as abrigam.

Na terceira parte dêste trabalho, a ser publicada oportunamente, estudarei o comportamento dos glóbulos vermelhos e dos valores hematológicos referentes aos mesmos nas infecções tratadas com quinina.

## THE PATHOGENIC ROLE OF EXOERYTHROCYTIC SCHIZONTS OF *P. GALLINACEUM*

### 1. PRELIMINARY EXPERIMENTS.

This is a report of the studies which were carried out preliminary to the investigation of the pathogenic role of the exoerythrocytic stages of *P. gallinaceum*. Further studies will be presented in subsequent papers.

1. Initially a brief account of the exoerythrocytic development of *P. gallinaceum* is given. It is emphasized that in infections produced by sporozoites the exo schizonts appear before the erythrocytic forms, since the former are a product of sporozoite division. When parasitized blood is injected, the first forms to appear are erythrocytic schizonts.

2. A review of the literature on the pathogenic action of exo forms is presented. The majority of these references have no sure experimental basis. Their brevity is out of keeping with the importance of the subject.

3. A report of the author's former observations which suggested the study of the pathogenic action of exo forms is given briefly. These observations were made in chicks which were inoculated with *P. gallinaceum* and given quinine treatment shortly afterwards. All of the control birds died before the 8th day following inoculation. While the treated chicks showed no acute rise of parasites they died between the 14th and 17th days following inoculation. The endothelial cells lining the capillaries of the central nervous system were found to be teeming with exo schizonts. The blood infection of these birds could not be suppressed by the treatment as a number of young trophozoites was always present in the red blood cells.

4. It was found advisable to determine some hematological values (number of erythrocytes and quantity of hemoglobin) in normal chicks, in view of the fact that the references in literature dealt with adult fowls. Eighty

chicks 5-10 days of age were examined (tables 1 and 1-a) with the following results (averages  $\pm$  standard errors):

Erythrocytes (millions per c.mm.).....	2.24 $\pm$ .035
Hemoglobin (gm. per 100 cc.).....	7.68 $\pm$ .126
Mean corpuscular hemoglobin ( $\gamma\gamma$ ).....	34 $\pm$ .461

These values are lower than those given for adult birds.

5. Observations were made to determine the tolerance of chicks to quinine hydrochloride given daily by mouth (150 mgm. per kilo. body weight). The birds were treated during 20 days. Throughout the whole course of the experiment no toxic symptoms were observed. At the end of the treatment the number of erythrocytes, the quantity of hemoglobin (table 2) and the visceral macro and microscopical pictures did not differ from those of normal birds.

6. In order to compare quinine treated infections with untreated ones, eighty 5-day old chicks were inoculated by intravenous route with parasitized blood (65,000,000 parasites to each bird) and separated into two batches (40 treated, 40 controls). Results are given in table 3. The length of life after inoculation ranged from 4 to 6 days in the controls and 10 to 15 days in the treated birds. The controls died with massive blood infection and showed no exo forms in the endothelial cells.

Treatment was commenced one day after injection. In treated birds blood parasites were always present in very few numbers up to the 7th day after inoculation. These were almost solely trophozoites or young schizonts showing signs of degeneration. From the 7th day onward the numbers of parasites began to increase slowly. Only trophozoites were seen and later stages were a very rare finding. At death, in nearly every case, there were about 20 trophozoites per 100 erythrocytes. It is assumed that the trophozoites which appeared in daily increasing numbers were derived from the exo forms developed in the RES cells as the endothelial cells of the central nervous system were blocked by exo schizonts and as quinine arrested the development of erythrocytic parasites.

7. In the following experiment (table 4) 30 chicks 5 days of age were inoculated intravenously with less than 2,800 parasites to each bird. These were divided into two equal lots — untreated controls and those administered quinine. All but two of the treated birds died between the 18th and 21st days after inoculation. The chicks showed a very mild blood infection

followed by an increase in trofozoites as referred to in (6). At death the exo infection was found to be very heavy.

Two of the control birds died at the peak of the blood infection, showing no exo forms in the central nervous system capillaries. The remaining 12 survived this period but died between the 21st and 24th days after inoculation, showing massive blockage of endothelial cells by exo schizonts. In this experiment the exo forms appeared in the control birds because these overcame the acute stage of the blood infection, thus giving time for the development of the exo cycle. From this point of view the resistance to acute infection in untreated birds was equivalent to quinine action in treated ones.

After the parasite decline the only erythrocytic forms found in various of the control birds were trophozoites which increased in number up to death. In these birds the lack of schizogonic development of the trophozoites which originated in the RES is assumed to reveal the action of parasitocidal antibodies acting like quinine in treated cases.

8. The next experiment was carried out to prove that the increasing erythrocytic trophozoites are derived from the exo schizogonies. A batch of chicks was inoculated intravenously and given quinine from the next day onward. Searches for parasites were made at intervals simultaneously in peripheral blood and in brain tissues (exoerythrocytic biopsies by cerebral puncture). The results are shown in table 5 and graph 2.

A striking parallelism was found to exist between the two curves (erythrocytic trophozoites and cerebral exo forms). In plate 2, moreover, the absolute morphological resemblance between erythrocytic trophozoites and mature exo forms is shown.

9. All of the treated cases referred to in this paper behave as the so-called "quinine-resistant" forms of human malaria. These observations suggest that "quinine-resistance" is a real phenomenon, but depends on the presence of exo forms. In other words, quinine-resistance is inherent to exo forms and never to erythrocytic ones.

10. Two cases of parasitic recrudescence in untreated birds are presented in which only trophozoites reappeared and increased in number up to death. These recrudescences occurred 20 days after the beginning of latency. In these birds the same parallelism as referred to in (8) between the curves of erythrocytic trophozoites and exo forms was observed during recrudescence.

The lack of schizogonic development of the trophozoites newly arrived in the blood, as observed in these cases, beyond suggesting the presence of

parasiticidal antibodies, seems to indicate that the malaria immunity processes are stimulated by erythrocytic parasites alone, as the exo forms continue fully their normal development.

11. In the quinine treated cases reported in this paper it was attempted to suppress the blood infection or at least to make it of no significance for the purpose of observing the possible pathogenic action of the exo schizonts. As may be seen it was not possible to eradicate the blood parasites, as a small but daily increasing number of trophozoites remained in every case.

It was also shown that the number of blood trophozoites reflects the intensity of the endothelial infection by the exo forms.

It seems impossible, therefore, to obtain a pure culture of the exo cycle in the host, i. e., without any vestige of blood infection.

It remains to be proved whether the pathogenic action of *P. gallinaceum* in treated cases, causing the death of the birds, depends on the continuous presence of trophozoites in increasing numbers in the blood, or on the uncontrollable development of exo forms in RES cells, or on the association of both factors. The investigations carried out on this subject will be published in subsequent papers.

## 2. THERAPEUTIC PROOF OF THE PATHOGENIC ROLE

This part of the work was carried out in order to give a therapeutic demonstration of the pathogenic action of exo schizonts.

Two experiments were made, with similar results.

1. Ten 5-day-old chicks (ns. 291-300) were inoculated intravenously and given quinine from the 3rd day onward. On the 8th day after inoculation these birds were separated into two batches (6 to continue treatment with quinine alone and 4 to be given sulfadiazine also).

All of the quinine treated birds (ns. 291-296) died between the 14th and 17th days after inoculation. The blood trophozoites increased in number at the end of the infection and the brain capillaries showed massive blockage by exo forms at death.

Brain punctures were made in the other four birds (ns. 297-300) and when exo schizonts were first seen sulfa treatment was started, 1.0 mgm per gram of body weight twice daily. Quinine treatment was continued once a day until the sulfa administration was stopped.

One bird (n. 297) was sacrificed on the 15th day of infection (4th of sulfa treatment). Its brain capillaries were heavily parasitized with numerous damaged exo forms and the blood was negative upon microscopical examination. The remaining birds (ns. 298-300) were given sulfa during 7, 7 and 8 days respectively. When treatment was suppressed brain punctures revealed damaged exo forms and blood smears were negative. Nevertheless a subpatent erythrocytic infection was present in each bird as it could be detected by subinoculation. After stopping treatment the blood parasites increased again to a moderate level and all birds died with heavy endothelial infection.

The birds treated with quinine-sulfa survived twice as long after inoculation as did those treated only with quinine (see table 6).

8. In a second experiment 50 chicks, 10 days old, were inoculated by intravenous route and divided into three groups (A, B and C).

The 10 birds of group A remained untreated and developed heavy blood infection which led to death between the 3rd and 5th days after inoculation.

Group B (25 birds) was treated with quinine alone, beginning the day after inoculation. All birds died between the 15th and 18th days of the infection, with abundant endothelial schizonts. As has always happened in similar experiments, death was preceded by increasing blood trophozoites (table 7, graph 3).

Group C (15 birds) was treated with quinine from the first day after inoculation to the 30th day. Sulfa was given in two courses as is shown in graphs 4 and 5. After treatment the behavior of the infection was similar to that seen in the experiment referred to under item 1. Five animals of this group were given a third course of sulfa (graph 5) during which all but one of them were sacrificed at given intervals in order to observe the alterations of the exo parasites which were produced by the drug.

In this experiment the greater survival of the birds treated with sulfa-quinine was observed again. The finding of exo schizonts altered by sulfa in the surviving birds indicates that the exo forms play a significant role in the death mechanism and that survival is a definite proof of the pathogenic action of exo forms.

3. In graph 6 the erythro and exoerythrocytic infections of bird 595 (group C) during the period preceding death are described. Thereby, it is possible to trace the revival of the exo cycle after treatment is stopped.

The revival of the exo cycle when the erythrocytic parasitism is counteracted by immunity is followed by the pouring of trophozoites into the blood. In this case the infection behaves like those treated by quinine. This suggests that the endothelial infection, as far as young chicks are concerned, does not bring the immunity mechanism into play. One can suppose also that the immunity stimulated by the erythro forms does not act against the exo parasites. This subject has been taken in consideration in the first part of this paper (item 10).

4. In plates 3 and 4 some aspects of the exo schizonts are reproduced as they appear after sulfa treatment. The alterations consist mainly of pyknosis, karyorrhexis and karyolysis. The most advanced stage of parasitic destruction seen in the examined material is that shown in fig. 8 of plate 3.

#### REFERENCIAS

ADLER, S. & I. TCHERNOMORETZ

1941. Continued passage of extra-erythrocytic forms of *Plasmodium gallinaceum* in the absence of erythrocytic schizogony. *Ann. Trop. Med. Parasit.* 35 (2) : 241-246.

BRUMPT, E.

1937. Schizogonie parfois intense du *Plasmodium gallinaceum* dans les cellules endothéliales des poules. *C. Rend. Soc. Biol.* 125 (22) : 810-813.

COATNEY, G. R. & W. C. COOPER

1944. The prophylactic effect of sulfadiazine and sulfaguanidine against mosquito-borne *Plasmodium gallinaceum* infection in the domestic fowl (preliminary report). *Pub. Health Repts.* 59 (45) : 1455-1458.

COGGESHALL, L. T., R. J. PORTER & R. L. LAIRD

1944. Prophylactic and curative effects of certain sulfonamide compounds on exoerythrocytic stages in *Plasmodium gallinaceum* malaria. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 57 (2) : 286-292.

FORKNER, C. E.

1929. Blood and bone marrow cells of the domestic fowl. *Jour. Exper. Med.* 50 (1) : 121-141.

FREIRE, S. A. & W. L. PARAENSE

1944. The prophylactic and curative action of sulfadiazine (2-sulfanilamide-pyrimidine), sulfapyridine (2-sulfanilamide-pyridine) and sulfanilamide (p. aminobenzo-sulfonamide) on the erythro and exo-erythrocytic cycles of "*Plasmodium gallinaceum*". (Therapeutical and parasitological aspects.) *Rev. Brasil. Biol.* 4 (1) : 27-48.

JACOBI, L.

1939. Beiträge zur Pathologie der Infektion des Huhnes mit *Plasmodium gallinaceum* (Brumpt). *Arch. Exper. Pathol. Pharmacol.* 191 (3-4) : 482-491.

## JAMES, S. P.

1939. The incidence of exo-erythrocytic schizogony in *Plasmodium gallinaceum* in relation to the mode of infection. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 32 (6) : 763-769.

## JAMES, S. P. &amp; P. TATE

1937. New knowledge of the life-cycle of malaria parasites. *Nature* (Londres) 139 (3517) : 545.

Preparations illustrating the recently discovered cycle of avian malaria parasites in reticulo-endothelial cells. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 31 (1) : 4-5.

1938. Exo-erythrocytic schizogony in *Plasmodium gallinaceum* Brumpt, 1935. *Parasitology* 30 (1) : 128-139.

## KIKUTH, W. &amp; L. MUDROW

1937. Über pigmentlose Schizogonieförmigen bei Vogel malaria. *Klin. Wochenschr.* 16 (48) : 1690-1691.

## KOHLSCHÜTTER, E., H. F. ZIPF &amp; G. TRILLER

1943. Zur Toxikologie der Malaria-mittel Plasmochin, Atebrin, Certuna und Chinin. *Arch. Exper. Pathol. Pharmacol.* 201 (4) : 402-416. Em *Trop. Dis. Bull.* 41 (6) : 454-455, 1944.

## PARAENSE, W. L.

1944. O ciclo exoeritrocitário dos parasitos da malária. *Mem. Inst. Osw. Cruz* 41 (3) : 469-493.
1945. Sobre a evolução dos plasmódios no retículo-endotélio. *Med. Cir. Farm.* 108 (abril) : 187-212.

## RAFFAELE, G.

1934. Un ceppo italiano di *Plasmodium elongatum*. *Riv. Malariol.* 13 (3) : 332-337.
1936. Il doppio ciclo schizogonico di *Plasmodium elongatum*. *Ibid.* 15 (5) : 309-317.
1938. La fase primaria dell'evoluzione monogonica dei parassiti malarici. *Ibid.* 17 (5) : 331-343.

## RODHAIN, J.

1939. L'infection a *Plasmodium relictum* chez les pingouins. *Ann. de Parasit.* 17 (2) : 139-157.

## SERGENT, Ed. &amp; M. BÉGUET

1914. De l'immunité dans le paludisme des oiseaux. Les pigeons guéris de l'infection a *Haemoproteus columbae* ne sont pas immunisés contre elle. *C. Rend. Soc. Biol.* 77 (1) : 21-23.

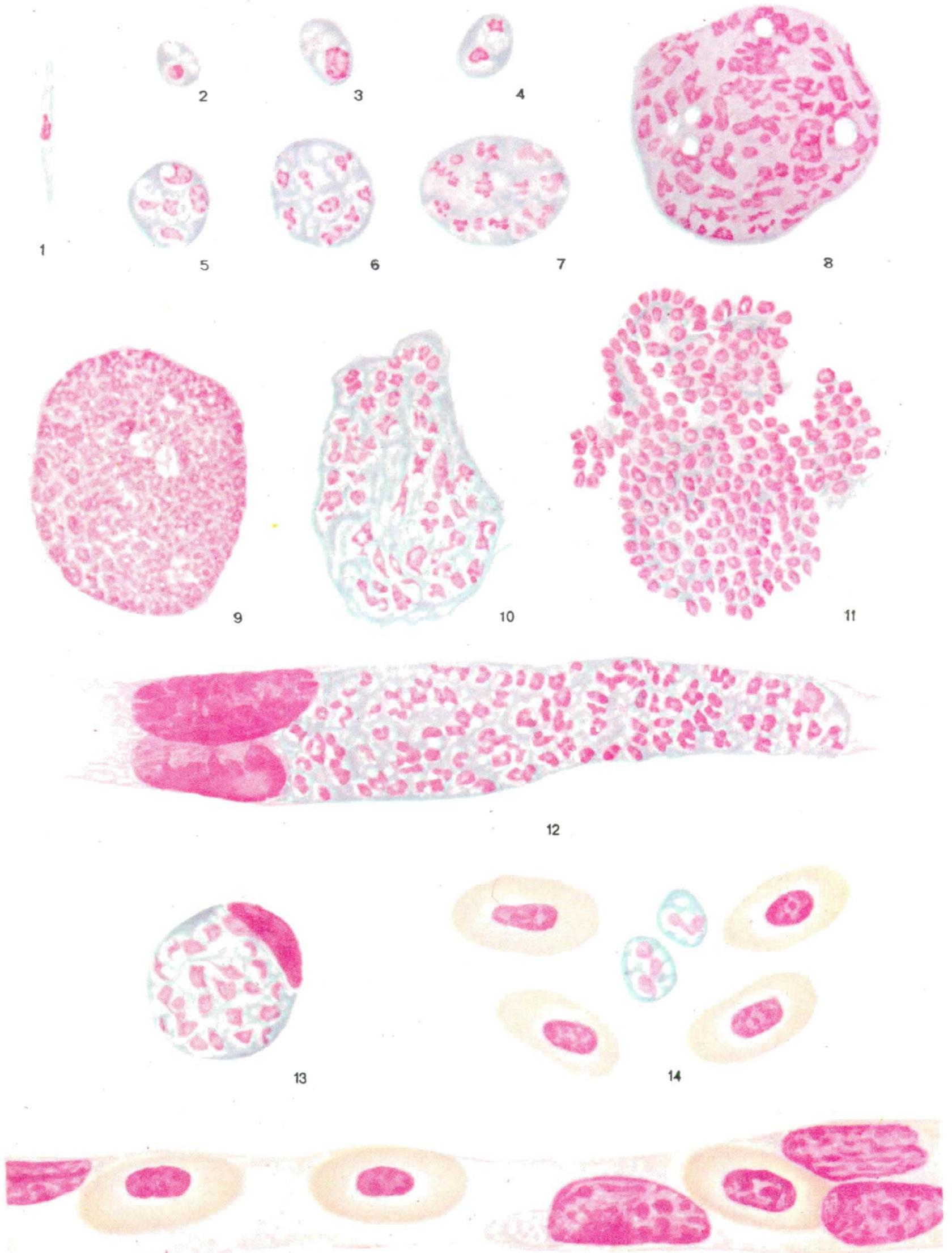
## WOLFSON, F.

1940. Exo-erythrocytic schizogony associated with the wood-thrush strain of *Plasmodium cathemerium* in relation to the species of the host. *Amer. Jour. Hyg.* 31 (1) Sec. C : 26-35.

## ESTAMPA 1.

- 1-11, aspectos sucessivos da evolução exoeritrocitária do *P. gallinaceum*. A evolução do parasito é intracelular, mas aparecem formas livres nos esfregaços, em consequência da rotura das células continentas. Foram desenhadas formas livres porque a sua textura é mais nítida, visto como não se acham recobertas pela membrana da célula parasitada.
- 1, esporozoíto da glândula salivar do mosquito.
  - 2, trofozoíto exo muito jovem.
  - 3, trofozoíto com núcleo volumoso, prestes a dividir-se.
  - 4-7, formas de divisão com número crescente de núcleos.
  - 8-9, formas de divisão muito avançada e dotadas de citoplasma fortemente basófilo.
  - 10, esquizonte quase maduro, a caminho da rotura.
  - 11, esquizonte maduro, libertando grande número de merozoítos. Estes merozoítos reiniciarão o ciclo exo em células do SRE, não sendo ainda infetantes para as hemácias. Depois de vários ciclos desta natureza, surgirão merozoítos menores (ver estampa 2), que darão as formas eritrocitárias.
  - 12, esquizonte exo em adiantada fase evolutiva, no endotélio de um capilar cerebral.
  - 13, esquizonte exo no interior de um monócito do sangue.
  - 14, dois jovens esquizontes exo encontrados livres em um preparado de sangue.
  - 15, capilar cerebral normal.

Preparados por distensão, fixados com álcool metílico e corados pelo Giemsa. Desenhos em câmara clara, microscópio Zeiss, oc. 10, obj. HI 100.



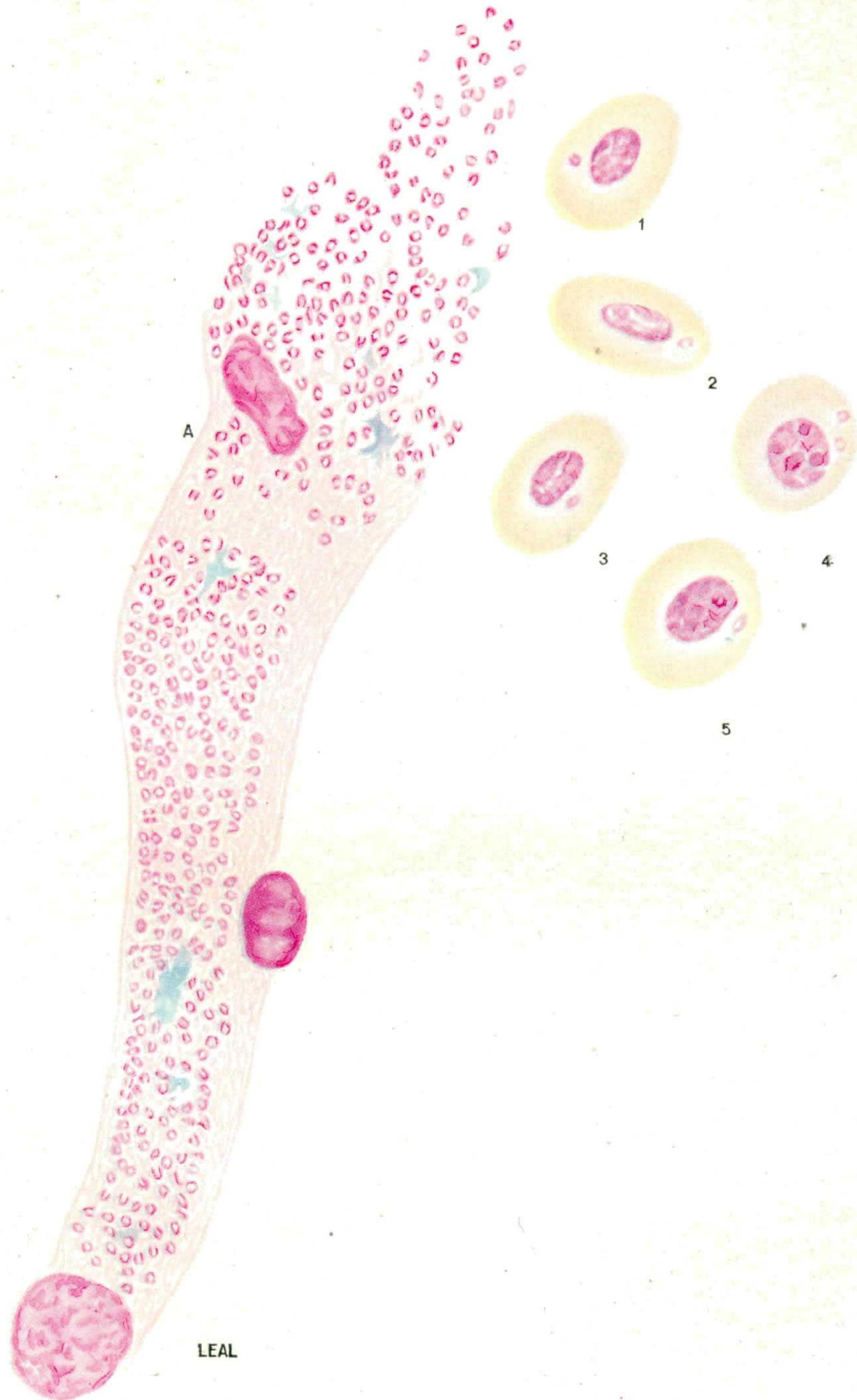
## ESTAMPA 2.

A, capilar cerebral (o mesmo da fig. 6), cuja rotura durante a confecção do preparado libertou inúmeros merozoítos exo. Observar a absoluta semelhança existente entre esses merozoítos e os trofozoítos das hemácias.

1-5, hemácias parasitadas por trofozoítos muito jovens, no mesmo preparado em que foi encontrado o capilar A.

Preparado por distensão, fixado com álcool metílico e corado pelo Giemsa.

Desenhos em câmara clara, microscópio Zeiss, oc. 10, obj. HI 100.



### ESTAMPA 3.

1 — 8, aspectos sucessivos da destruição das formas exo do *P. gallinaceum* nos animais tratados com sulfadiazina.

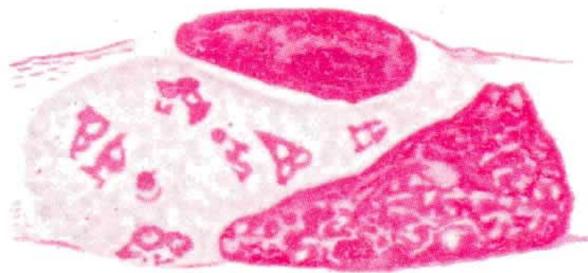
1, esquizonte com núcleos em início de picnose. 3.<sup>a</sup> dose de sulfa.

2, esquizonte com figuras de picnose muito nítidas; início de cariorrexe e cariólise nos núcleos restantes; vacuolização do citoplasma. 5.<sup>a</sup> dose.

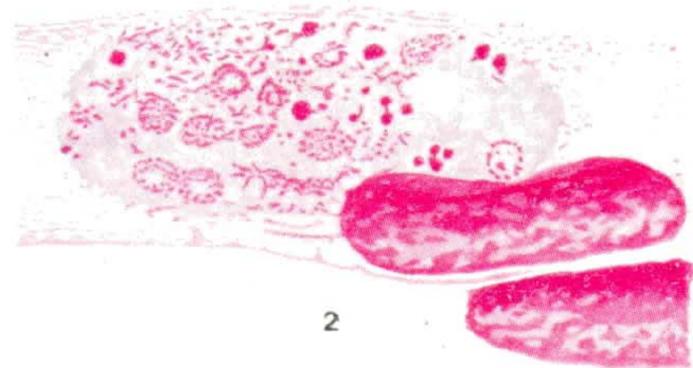
3-7, diversas etapas dos processos de cariorrexe e cariólise. 7.<sup>a</sup> dose.

8, vestígio de uma forma exo, com aspecto de poeira cromatínica espalhada sobre fundo azulado constituído pelo resíduo do citoplasma; cariólise quase completa. 9.<sup>a</sup> dose.

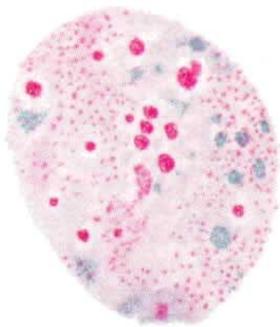
Desenhos em câmara clara. Microscópio Zeiss, obj. HI 100, oc. 10.



1



2



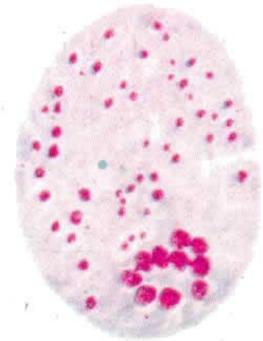
3



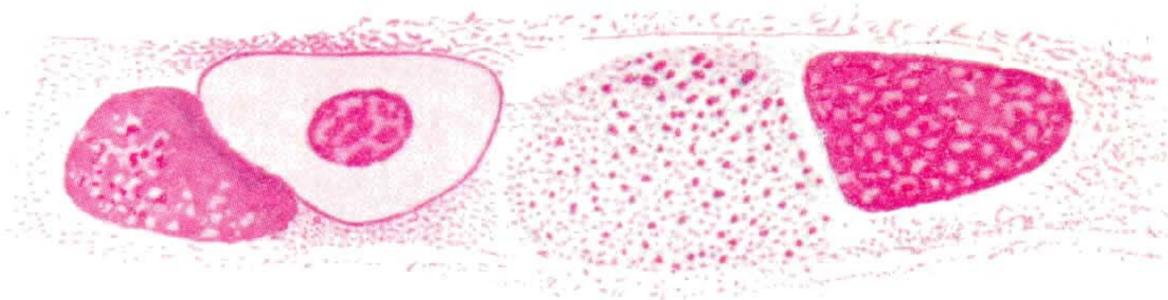
4



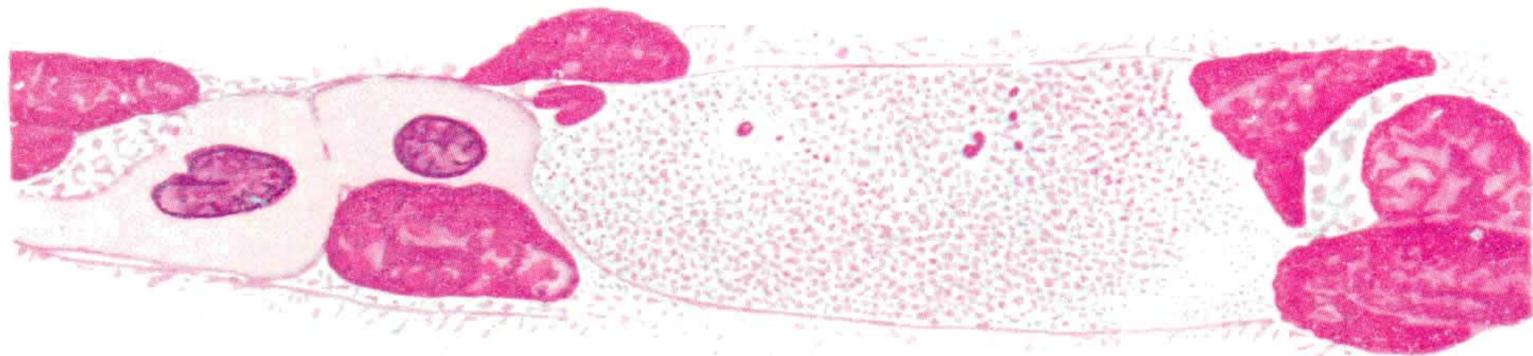
5



6



7



8

LEAL

#### ESTAMPA 4.

1 — 7, diversos aspectos da destruição das formas exo do *P. gallinaceum* nos animais tratados com sulfadiazina.

1, lado esquerdo, esquizonte representado na fig. 2 da est. 3. x 700.

1, lado direito, esquizonte em adiantada cariorrexe. x 700.

2, esquizonte em cariorrexe. x 700.

3, forma representada na fig. 6 da est. 3. x 700.

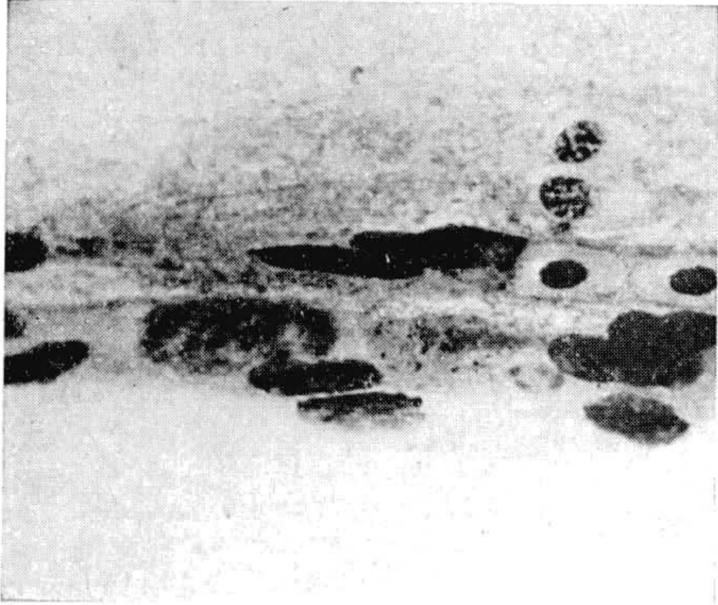
4, forma representada na fig. 7 da est. 3. x 700.

5, forma representada na fig. 8 da est. 3. x 700.

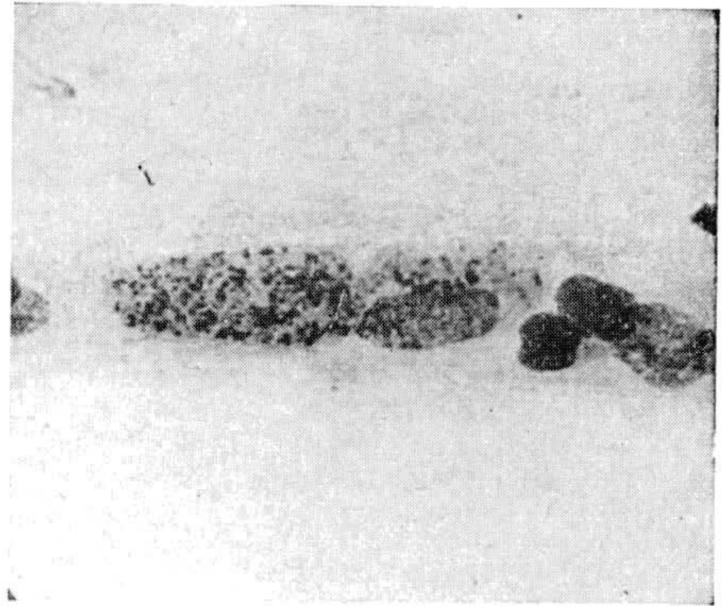
6, forma representada na fig. 5 da est. 3. x 1.400.

7, estágio semelhante ao da fig. 5. x 1.400.

Fotos de J. Fontes.



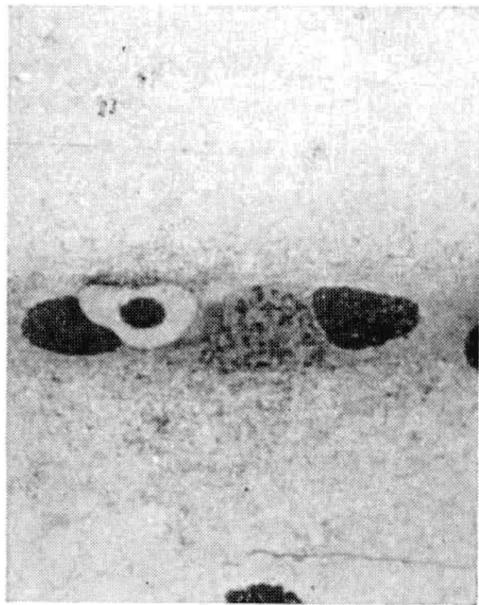
1



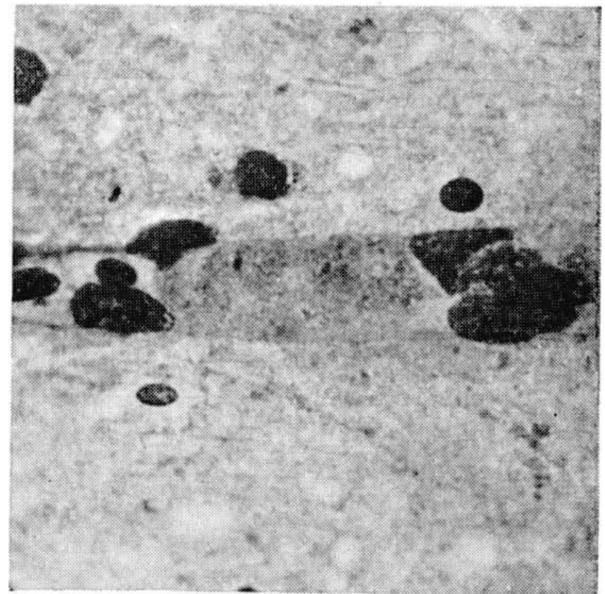
2



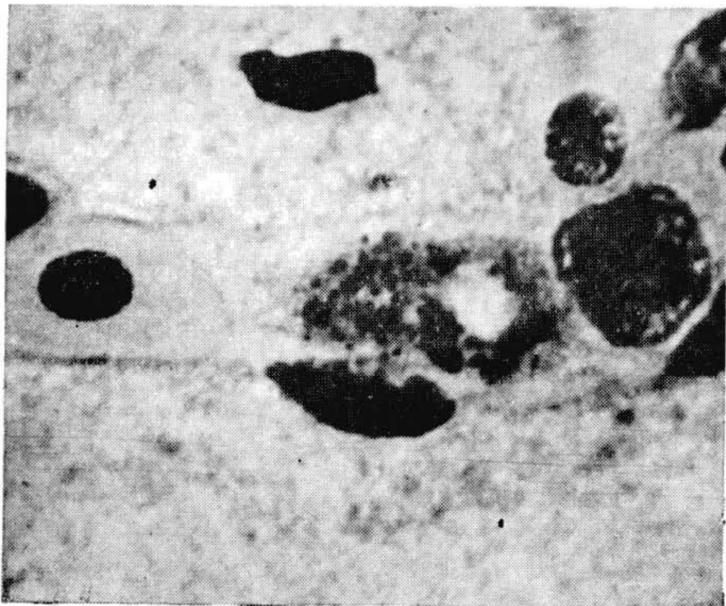
3



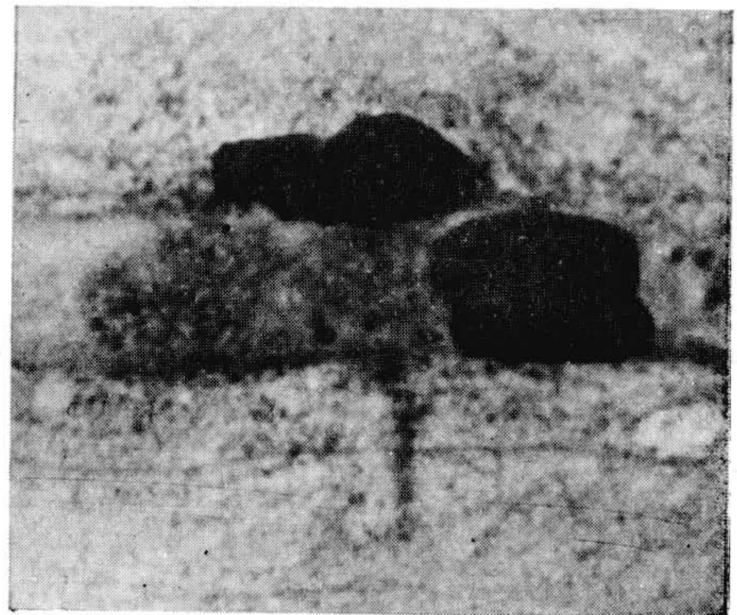
4



5



6



7