

## Ação patogênica das formas exo-eritrocitárias do *Plasmodium gallinaceum*

### 3. Algumas características das hemácias nas infecções tratadas com quinina

por

W. Lobato Paraense

(com 2 tabelas)

Como ficou visto na parte já publicada deste trabalho (1946), os fatos experimentais ali analisados permitem acreditar que a infecção endotelial, nas condições desta investigação, representa o papel mais importante na marcha e no desfêcho da malária *gallinaceum* tratada com a quinina.

Por outro lado, ficou então demonstrado que, nas infecções tratadas precocemente com o referido medicamento, a fim de eliminar os parasitos das hemácias e deixar em campo apenas as formas exo-eritrocitárias, não é possível atingir integralmente este objetivo. Os animais submetidos à terapêutica apresentam inicialmente alguns trofozoítos eritrocitários, que não se multiplicam sob a ação da quinina, mas cujo número aumenta gradativamente no decurso da infecção e alcança, em muitos casos, grandezas relativamente elevadas. A infecção nestas condições termina pela morte do hospedeiro, encontrando-se neste momento, em cada caso, o número máximo de trofozoítos observados durante a respectiva curva parasitária. Estes trofozoítos, conforme foi demonstrado, são idênticos aos merozoítos exo maduros que, lançados à circulação sanguínea, invadem os glóbulos vermelhos onde são destruídos.

Os animais assim tratados apresentam, ao exame necroscópico, infecção exo maciça dos endotélios dos capilares cerebrais, a qual foi considerada como a causa da morte.

Entretanto, como o número de trofozoítos lançados ao sangue é sempre bastante apreciável no fim da infecção, tornou-se necessário investigar quais as conseqüências que poderiam advir, para o hospedeiro, da presença continuada destes parasitos nos glóbulos vermelhos. Em outras palavras, era preciso verificar se a morte dos animais tratados podia ser atribuída, direta ou indiretamente, à ação dos trofozoítos das hemácias.

O exame cadavérico das aves que morreram nessas condições não sugeria a participação dos parasitos eritrocitários no desfêcho da infecção, pois o aspecto macroscópico dos órgãos não revelava a existência de melanose ou de apreciável deficiência hemoglobínica e alterações correlatas. Não sendo possível, entretanto, chegar a conclusões exatas sôbre base assim grosseira, foram planejadas pesquisas tendentes a verificar o papel dos trofozoítos das hemácias nas condições em que foram feitas aquelas constatações.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os resultados obtidos neste sentido estão baseados na observação de um grupo constituído inicialmente por 35 pintos Light Sussex, inoculados aos 10 dias de idade, por via intra-venosa. Cada ave recebeu cêrca de 20.000.000 de parasitos eritrocitários. Trata-se dos mesmos animais (ns. 556 a 590) referidos na parte 2<sup>a</sup> dêste trabalho, publicada anteriormente (1946: *Prova terapêutica da ação patogênica*). Estas aves encontram-se ali referidas na 2<sup>a</sup> experiência, constituindo os grupos A e B. Os dados já publicados sôbre êsse lote de animais não serão aqui repetidos. Tratarei apenas dos fatos relacionados à experiência que está sendo agora descrita.

Nos dias que antecederam a inoculação foram determinados, em todos os animais, o número de hemácias, o hematócrito e a hemoglobina. Com os dados assim obtidos, foram calculadas as constantes corpusculares (volume médio, hemoglobina média e concentração da hemoglobina no corpúsculo médio).

Os animais foram então inoculados e separados nos grupos A e B.

As aves do grupo A, como foi visto, ficaram sem tratamento, morrendo entre o 3.<sup>o</sup> e o 5.<sup>o</sup> dias seguintes à inoculação.

As 25 aves do grupo B foram tratadas com quinina, a partir do dia seguinte à inoculação e até o dia da morte de cada animal. Tôdas elas morreram entre o 15.<sup>o</sup> e o 18.<sup>o</sup> dias da infecção, nas condições já assinaladas (1946, 2.<sup>a</sup> parte).

As determinações hematológicas acima referidas foram repetidas no maior número possível de aves quando estas apresentavam sinal de morte próxima. Os resultados conseguidos destinaram-se à comparação com aqueles encontrados antes da inoculação. Além disso, foram feitas contagens de reticulócitos.

Foram assim examinadas *in extremis* 6 aves do grupo A e 16 do grupo B. As observações dos animais restantes, cuja morte ocorreu em certas horas

da noite, ficaram prejudicadas pela falta das determinações finais, não constando desta parte do trabalho.

#### NÚMERO DE GLÓBULOS VERMELHOS

Para a determinação do número de eritrócitos utilizei a técnica descrita na 1.<sup>a</sup> parte (*Investigações preliminares*), publicada em 1946.

Neste e em outros processos nos quais se usa a picada de um vaso sanguíneo, deve-se escolher uma veia bem superficial para evitar os grandes hematomas cuja produção é freqüente nestas aves. Assim o sangue jorra quase diretamente da ferida vascular, evitando-se também a coagulação rápida que ocorre quando há um contato mais demorado com o tecido subcutâneo.

Para a diluição de tôdas as amostras de sangue foi sempre utilizada a mesma pipeta de Thoma, sendo feitas as contagens sempre na mesma célula de uma câmara de Neubauer.

#### HEMATÓCRITO

Para esta determinação é utilizado o micro-hematócrito de Van Allen. Aspira-se primeiro o sangue até o traço 10 da haste do aparelho, e em seguida o líquido diluidor (solução aquosa de oxalato de sódio a 1.3%), até encher cerca de 2/3 da empola. A pipeta é cerrada por meio do clipe, ligeiramente agitada, centrifugando-se em seguida a 3.500 rotações durante 30 minutos. Duas precauções essenciais ao bom êxito do método são a perfeita secagem do oxalato antes de ser pesado e a renovação do líquido diluidor pelo menos uma vez por semana. De cada amostra de sangue são feitas duas determinações simultâneas.

#### HEMOGLOBINA

A hemoglobina é dosada sob a forma de oxi-hemoglobina, em colorímetro foto-elétrico «Lumetron». O sangue obtido por punção de uma veia é aspirado em pipeta «Glasco» calibrada a 20 mm<sup>3</sup>. Limpa-se o excesso de sangue da ponta da pipeta e mistura-se o conteúdo desta com 8 cm<sup>3</sup> de solução aquosa de carbonato de sódio a 0.1%. Para fazer a determinação, coloca-se o líquido em um tubo do colorímetro e procede-se à leitura usando o filtro verde 530 e comparando com água destilada.

O aparelho que utilizo foi padronizado na Seção de Hematologia (dirigida pelo Dr. Walter O. Cruz), por comparação com um colorímetro foto-elétrico de Klett-Summerson da referida Seção, que por sua vez havia sido

padronizado pela determinação do ferro hemático segundo o processo de Wong (1928). Como resultado dessa comparação, verificou-se que, fazendo a leitura na escala em vermelho (logarítmica) do «Lumetron», basta multiplicar o valor encontrado pela constante 0.573 para obter o conteúdo de hemoglobina em gramas por 100 cm<sup>3</sup> de sangue.

Na 1.<sup>a</sup> parte deste trabalho (1946) verifiquei que o conteúdo médio de hemoglobina, em 80 pintos normais, nas condições em que são mantidos no meu laboratório, era de 7.6 g  $\pm$  0.126 (erro padrão). Sendo este um valor relativamente baixo, tomei por norma fazer duas pipetagens quando se trata de animais normais, e quatro no caso de aves com acentuada anemia, dividindo depois o resultado obtido pelo número de pipetagens. Com esta prática são evitadas as regiões extremas da escala do colorímetro.

Logo nas primeiras determinações da hemoglobina no sangue de pintos, preocupou-me o fato de lidar com glóbulos vermelhos nucleados. Nas hemácias do homem, e em geral dos vertebrados apirenematosos, o estroma globular, depois de ceder o pigmento à solução hemolítica, não altera significativamente a turbidez do líquido. Nos casos de leucemia, entretanto, a solução fica mais turva devido à presença dos glóbulos brancos em quantidade exagerada, e por isso é necessário centrifugar o líquido antes da determinação. Julguei, portanto, indicada a centrifugação no caso das aves, pensando que a existência de tão grande quantidade de núcleos pudesse falsear os resultados da colorimetria. Mas ao contrário do que esperava, não verifiquei diferenças apreciáveis entre as determinações feitas em numerosas amostras, antes e depois da centrifugação. Até alguns minutos depois da hemólise, a solução de hemoglobina mantém-se perfeitamente límpida, não havendo necessidade da centrifugação. Algum tempo depois, entretanto, observa-se a formação de um floco esbranquiçado, formado pela conglomeração dos restos celulares. Quando se transfere o líquido para a proveta do colorímetro, este floco tende a sobrenadar a solução, ficando fora do limite superior da abertura por onde passa o feixe luminoso. Em certas amostras o floco parece mais compacto, e neste caso deposita-se no fundo do tubo. Se ele se antepõe à passagem da luz, é fácil retirá-lo com uma pinça, restituindo-se ao líquido a primitiva limpidez.

No sangue malárico, grande parte da hematina formada pelo parasito fica aprisionada nessa massa de restos celulares. Outra parte, entretanto, permanece em suspensão na solução de hemoglobina, aumentando a turbidez do líquido. Quando se lida com sangue parasitado é indispensável, portanto, a centrifugação. Terminada esta, encontra-se um sedimento de hema-

tina, e a dosagem da hemoglobina dá valores mais baixos. Como exemplo, citarei as determinações feitas em dois casos:

	CASO I	CASO II
Antes da retirada do floco .....	6.3	4.0
Depois da retirada do floco .....	5.1	3.1
Depois da centrifugação .....	4.0	2.5

#### CONSTANTES CORPUSCULARES

O *volume corpuscular médio* é representado pela relação

$$\frac{\text{hematócrito em cm}^3 \text{ por } 1.000 \text{ cm}^3}{\text{hemácias em milhões por mm}^3}$$

e expresso em microns cúbicos ( $\mu^3$ ).

A *hemoglobina corpuscular média* é avaliada segundo a relação

$$\frac{\text{hemoglobina em g por } 1.000 \text{ cm}^3}{\text{hemácias em milhões por mm}^3}$$

e expressa em micromicrogramas ( $\gamma\gamma$ ).

A *concentração da hemoglobina corpuscular média* é representada pela relação

$$\frac{\text{hemoglobina em g por } 100 \text{ cm}^3 \times 100}{\text{hematócrito em cm}^3 \text{ por } 100 \text{ cm}^3}$$

e expressa em forma de percentagem. Este dado corresponde ao teor de hemoglobina existente em 100 partes da substância da hemácia média.

#### NÚMERO DE RETICULÓCITOS

Coloca-se sobre uma lâmina uma gota da seguinte solução:

Oxalato de sódio .....	1.1 g
Azul cresil brilhante .....	0.2 g
Água destilada .....	100 cm <sup>3</sup>

Mistura-se ao corante uma gota de sangue e recobre-se com uma lâmina escavada. Decorridos 3 minutos faz-se com este material um preparado por

distensão. Fixa-se com álcool metílico e cora-se com o Giemsa. Contam-se 500 eritrócitos encontrados sucessivamente, anotando-se os reticulócitos. O número destes é finalmente expresso em forma de percentagem.

## RESULTADOS

Os resultados desta experiência acham-se representados na tabela 1 para os animais não tratados (grupo A) e na tabela 2 para os animais tratados (grupo B).

### NÚMERO DE HEMÁCIAS

As aves do grupo A sofreram grande baixa do número de hemácias, conseqüente à ação da elevada quantidade de parasitos eritrocitários, como era de esperar tratando-se de infecções agudas rapidamente mortais.

Nas aves do grupo B, esta diminuição numérica das hemácias também se fez sentir na grande maioria dos casos, com exceção de quatro. Na ave 581 houve, mesmo, um aumento de 400.000 glóbulos. Vê-se, porém, que os números encontrados nas proximidades do momento da morte, embora mais baixos do que no princípio da experiência, acham-se em grande parte dentro dos limites normais. Isto pode ser verificado recorrendo-se às tabelas 1 e 1-A da 1.<sup>a</sup> parte deste trabalho (1946). Observa-se também que os menores valores assinalados neste grupo estão bastante próximos do limiar inferior da normalidade.

Nos casos tratados não foi possível subordinar a diminuição numérica das hemácias a uma causa diretamente relacionada à ação parasitária, como sejam por exemplo a quantidade de trofozoítos eritrocitários ou a intensidade da infecção pelas formas exo. Parece mais acertado atribuí-la à destruição dos glóbulos parasitados, em conseqüência da ação fagocitária das células do sistema retículo-endotelial, e não em conseqüência da multiplicação dos parasitos, que foi impedida pela quinina. De fato, o exame histológico das vísceras de maior importância retículo-endotelial (fígado e baço), em todos os animais tratados, revelou a existência de grande atividade espodofágica, principalmente da parte dos elementos reticulares na polpa esplênica e das células de Kupffer no fígado. São aí encontrados abundantes detritos celulares, podendo-se reconhecer entre eles glóbulos vermelhos ainda bem conservados, muitos dos quais evidentemente parasitados. É compreensível que a hemácia, invadida por um parasito, sofra considerável alteração na sua estrutura físico-química, suficiente para transformá-la em um elemento

TABELA 1

VALORES ENCONTRADOS PARA HEMÁCIAS, HEMATÓCRITO, HEMOGLOBINA E CONSTANTES CORPUSCULARES, ANTES DA INOCULAÇÃO E NO MOMENTO DA MORTE, E PARA RETICULÓCITOS NO MOMENTO DA MORTE, EM PINTOS DO GRUPO A, INOCULADOS COM *P. GALLINACEUM* E NÃO TRATADOS

AVE N.º	HEMÁCIAS milhões/mm <sup>3</sup>		HEMATÓCRITO %		HEMOGLOBINA g/100 cm <sup>3</sup>		V. C. M. μ <sup>3</sup>		H. C. M. γγ		C. H. C. M. %		RETICULO- CITOS %	DIA DA MORTE (após ino- culação)
	I	F	I	F	I	F	I	F	I	F	I	F		
558.....	2.3	0.8	29	13	6.9	2.3	126	162	30	29	24	18	58	5.º
559.....	2.0	0.6	29	10	6.3	1.6	145	167	31	27	22	16	40	5.º
560.....	2.1	0.6	26	10	5.4	1.4	124	167	26	23	21	14	29	5.º
562.....	2.5	0.9	31	12	7.7	2.0	120	133	30	22	25	17	12	3.º
563.....	2.4	0.7	30	11	7.2	1.4	125	157	30	20	24	13	54	4.º
565.....	2.1	0.5	25	10	6.3	1.4	124	200	30	28	24	14	60	5.º

V. C. M. volume corpuscular médio.  
 H. C. M., hemoglobina corpuscular média.  
 C. H. C. M., concentração da hemoglobina corpuscular média.  
 I. início da experiência.  
 F. fim da experiência.

TABELA 2

VALORES ENCONTRADOS PARA HEMÁCIAS, HEMATÓCRITO, HEMOGLOBINA E CONSTANTES CORPUSCULARES, ANTES DA INOCULAÇÃO E NO MOMENTO DA MORTE, E PARA RETICULÓCITOS NO MOMENTO DA MORTE, EM PINTOS DO GRUPO B, INOCULADOS COM *P. GALLINACEUM* E TRATADOS COM QUININA.

AVE N.º	HEMÁCIAS milhões/mm <sup>3</sup>		HEMATÓCRITO %		HEMOGLOBINA g/100cm <sup>3</sup>		V. C. M. μ <sup>3</sup>		H. C. M. γγ		C. H. C. M. %		RETICULO- CITOS %	DIA DA MORTE (após ino- culação)
	I	F	I	F	I	F	I	F	I	F	I	F		
566.....	2.0	1.5	25	23	6.0	4.9	125	144	30	31	24	21	25	16.º
567.....	2.5	2.4	29	27	7.4	5.7	116	112	30	24	25	21	11	16.º
569.....	2.5	2.1	30	24	6.6	5.1	120	114	26	24	22	21	9	17.º
571.....	2.1	2.2	27	27	6.0	4.6	128	123	28	21	22	17	14	16.º
572.....	2.3	1.7	28	21	6.3	4.8	122	123	27	28	22	23	12	18.º
573.....	2.3	1.6	30	22	7.4	5.2	130	137	32	32	25	24	16	17.º
576.....	2.2	1.7	28	25	6.3	5.2	127	147	29	30	22	21	28	18.º
577.....	2.1	1.6	25	22	6.3	5.0	119	137	30	31	25	23	16	17.º
581.....	2.2	2.6	26	30	7.2	6.6	118	115	33	25	28	22	10	17.º
583.....	2.8	1.6	33	20	7.7	3.8	118	125	27	24	23	19	13	16.º
584.....	3.0	2.2	30	26	8.3	6.0	100	118	28	27	27	23	16	18.º
585.....	2.0	2.0	23	24	6.3	6.3	115	120	31	31	27	26	15	17.º
586.....	2.2	2.2	24	23	6.0	6.0	109	104	27	27	25	26	12	16.º
587.....	2.6	2.1	29	25	7.1	4.8	111	119	27	23	24	19	9	17.º
588.....	1.9	1.4	24	17	6.0	3.4	126	121	31	24	25	20	14	16.º
589.....	2.5	2.1	30	25	7.3	5.7	120	119	29	27	24	23	13	17.º

V. C. M., volume corpuscular médio.  
 H. C. M., hemoglobina corpuscular média.  
 C. H. C. M., concentração da hemoglobina corpuscular média.  
 I. início da experiência.  
 F. fim da experiência.

anormal sujeito a ser removido do meio sanguíneo. No mecanismo desta remoção entra como fator de grande importância a atividade fagocitária do SRE.

#### HEMATÓCRITO

Em tôdas as aves examinadas os valores obtidos para o hematócrito acompanharam as variações do número de hemácias. No grupo A houve uma baixa muito acentuada desses valores. No grupo B manifestou-se nítida tendência à diminuição, muito menor, entretanto, que nos animais do grupo não tratado.

#### VOLUME CORPUSCULAR MÉDIO

Os dados que acabam de ser apresentados (número de hemácias e hematócrito) permitem considerar o volume da hemácia média nos casos em estudo.

Na avaliação do volume corpuscular médio, assim como da hemoglobina corpuscular média, entra como um dos termos da relação o número de hemácias calculado pela contagem. Como se sabe, esta contagem constitui um processo hematológico sujeito a múltiplas causas de erro, ao contrário das determinações da hemoglobina e do hematócrito. Para compensar até certo ponto esta deficiência do método foram feitas simultaneamente duas contagens no sangue de cada animal, utilizando sempre a mesma pipeta diluidora e o mesmo lado de uma só câmara de Neubauer. No caso de serem encontrados números significativamente discordantes, as contagens foram repetidas até apresentarem resultados satisfatórios.

Nas aves do grupo A observou-se constante aumento do volume globular. Na ave 562 este aumento foi menos acentuado que nas demais, e isto deve ser relacionado à menor duração da infecção aguda, pois este animal morreu no 3.º dia após a inoculação, não dando tempo a uma reação eficiente da medula óssea (reticulocitose de apenas 12%). Quanto aos outros animais, que morreram no 4.º e 5.º dias, a forte resposta reticulocitária coincidiu com grande aumento do volume corpuscular médio.

A anemia malárica, segundo se sabe, é do tipo normocítico. Nas espécies em que a multiplicação dos parasitos até altos limites é bem tolerada pelo organismo observa-se que, ao ser atingido um alto nível de destruição globular, aparece grande quantidade de hemácias jovens na circulação (reticulócitos e eritroblastos basófilos e policromatófilos). Este derrame de células imaturas, que reflete a hiperatividade da medula óssea, provoca a



subida do volume corpuscular médio a valores muito elevados, visto como as formas jovens são bem maiores que as maduras. Não se trata, porém, de verdadeira macrocitose no sentido que dão os hematologistas a esta expressão. Trata-se de um aumento volumétrico passageiro, devido à reticulocitose. Quando o animal resiste à infecção aguda, o que muito frequentemente ocorre nas aves adultas, o volume regride em poucos dias aos valores normais, em consequência do rápido amadurecimento daquelas células jovens.

No lote dos animais tratados as modificações do volume globular foram menos acentuadas do que no grupo testemunho. Quando houve modificação apreciável, esta se fez no sentido do aumento. Não foram, porém, atingidos os altos valores do grupo não tratado. A reticulocitose não foi em geral muito acentuada, variando na maioria dos casos entre 9 e 16%. Apenas duas vezes apareceram valores mais altos (25 e 28%), devendo-se notar que correspondem a casos em que o volume médio se mostrou muito aumentado.

#### HEMOGLOBINA

Nos animais do grupo A a quantidade de hemoglobina desceu a valores baixíssimos, decaindo também, embora muito menos, no grupo B.

Cotejando os resultados finais do grupo B com os valores normais constantes das tabelas 1 e 1-A da 1.<sup>a</sup> parte já citada (1946), vê-se que, em 4 casos deste grupo, o conteúdo de hemoglobina ficou dentro dos limites normais. Dos animais restantes, 6 apresentaram um teor entre 5 e 5.9 g, e os 6 últimos ficaram abaixo de 5 g.

#### HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MÉDIA

O teor do sangue em hemoglobina decresce na malária em consequência de duas causas principais: a diminuição do número de hemácias e a baixa do valor globular devida à ação do parasito. A hemoglobina da hemácia constitui a substância alimentar primordial utilizada pelo plasmódio durante a fase eritrocitária do seu desenvolvimento. Isto quer dizer que uma hemácia parasitada é um elemento cujo teor em hemoglobina vai diminuindo à medida que no seu interior cresce o parasito. O grau de anemia da hemácia média é indicado pelo valor da hemoglobina corpuscular média.

No grupo não tratado o valor desta característica mostrou nítida tendência decrescente.

No grupo tratado esta mesma tendência revelou-se em cerca de 1/3 dos casos. Nos 2/3 restantes não houve sensível alteração dos valores iniciais.

## CONCENTRAÇÃO DA HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MÉDIA

Esta é a mais exata das três constantes aqui referidas porque depende de dados sujeitos a um número mínimo de causas de erro. Por isso mesmo as suas variações apresentam menor amplitude no estado normal e são mais significativas nos estados patológicos.

Enquanto a hemoglobina corpuscular média corresponde à quantidade absoluta de hemoglobina contida na hemácia média, a concentração da hemoglobina no corpúsculo médio exprime a quantidade desta substância existente em 100 partes da hemácia. Disso resulta que, em glóbulos normocrômicos, o valor da hemoglobina corpuscular média tende a variar em função do volume globular, ao passo que a concentração permanece inalterada. A pequena variabilidade da concentração da hemoglobina na hemácia normal é explicada pelo fato de exprimir esta constante uma relação quantitativa entre a hemoglobina e os demais componentes globulares. Isto faz compreender porque, no estado normal, existe um ótimo de concentração cujo valor é quase o mesmo em toda a série dos vertebrados, um nível de saturação que nem a administração maciça de substâncias antianêmicas permite ultrapassar. Devido a este fato, a baixa do valor da concentração é altamente significativa de deficiência hemoglobínica.

Os valores desta constante decaíram consideravelmente nas aves não tratadas. No grupo B constatou-se uma diminuição muito menos acentuada em cerca da metade dos casos, permanecendo inalterada a outra metade. A baixa da concentração acha-se em nítida correspondência com a utilização da hemoglobina corpuscular pelo plasmódio. Nos casos não tratados a utilização foi livre, mas não ultrapassou as fases iniciais nas aves tratadas, devido à ação medicamentosa precoce sobre os parasitos.

## RETICULÓCITOS

No grupo não tratado a reação reticulocitária foi muito intensa em todos os animais, exceto na ave 562, que morreu no 3.º dia da infecção. Esta alta reticulocitose é consequência da grande destruição de hemácias circulantes. Na ave 562 encontrou-se a menor percentagem porque não houve tempo suficiente para a reação eritropoética exteriorizar-se no quadro hemático.

No grupo tratado a reticulocitose conservou-se em nível pouco elevado, naturalmente devido à menor solicitação periférica.

O método utilizado para a evidenciação dos reticulócitos não foi o mais satisfatório. Quando se examina o sangue de mistura com o corante vital e montado entre lâmina e lamínula, aparece maior número de reticulócitos

do que no material dessecado e supercorado pelo Giemsa. Isto acontece porque no primeiro caso a coloração é direta, atingindo mesmo os reticulócitos mais antigos, dotados de mínima quantidade de substância reticular. No último caso, entretanto, o corante que provocou a reação grânulo-filamentosa é dissolvido pelo álcool metílico e substituído pelo azul de metileno do Giemsa. É possível que a substituição seja incompleta, evidenciando-se apenas nos reticulócitos mais jovens.

A contagem de reticulócitos foi feita em preparados a sêco por motivo de maior comodidade. Se fôsse utilizado material frêsko as mensurações teriam de ser feitas imediatamente, o que seria impossível em muitos casos, nas circunstâncias dêste trabalho.

A percentagem normal de reticulócitos no sangue de pintos com poucos dias de idade ainda não foi determinada com aproximada exatidão. Não fiz contagens antes da inoculação por julgar precária a comparação dos números assim obtidos com os resultados finais. Ainda não possuo dados bastante numerosos, mas parece-me que o número normal é de cêrca de 10%, sujeito porém a amplas variações nos diferentes animais. Por outro lado, as variações individuais são complicadas pelo fato de se estar lidando com aves de poucos dias de idade, sujeitas à diminuição gradual do número de reticulócitos em função do tempo de vida.

## DISCUSSÃO

Das observações que acabam de ser referidas, conclui-se que todos os animais não tratados e quase todos os tratados apresentaram certo grau de anemia de intensidade variável conforme o grupo a que pertenciam.

No grupo não tratado a anemia foi profunda. Entre os tratados houve dois casos em que os valores determinados não se afastaram da normalidade (ns. 585 e 586), ao lado de outros que apresentaram números subnormais.

A principal conseqüência do desenvolvimento das formas eritrocitárias é a anemia, que depende de duas causas elementares: a utilização da hemoglobina pelo plasmódio em evolução na hemácia e a final destruição do glóbulo pelo parasito maduro e pelos fagócitos.

Nos casos que evoluem sem tratamento a anemia é profunda, encontrando-se valores muito baixos na fase culminante do período agudo, tanto para o número de hemácias como para o conteúdo de hemoglobina. Nestes casos o hematócrito acompanha naturalmente a queda do número de hemácias. Os valores hematológicos podem ser recuperados quando o organismo consegue vencer a crise aguda, o que acontece freqüentemente nas aves adultas.

Os animais muito jovens, como são aqueles usados nesta experiência, só excepcionalmente resistem ao ataque agudo não tratado.

Nas infecções pelo *P. gallinaceum*, segundo os dados que tenho conseguido, o ataque agudo leva o animal à morte quase com toda a certeza quando os valores chegam em torno de 600.000 para as hemácias e 1.5 g para a hemoglobina. Estes números correspondem a cerca de  $\frac{1}{4}$  dos que são mais frequentemente encontrados no estado normal.

Nos casos tratados desta experiência observa-se que nunca foi atingida essa relação, nem ao menos a de  $\frac{1}{2}$ , que muito excepcionalmente se apresentou em um só caso (n.º 583) para a hemoglobina. Mesmo quando houve uma diminuição bem significativa dos valores, não me parece que tenham sido atingidos teores incompatíveis com a vida. Nos ataques agudos muito intensos, que levam os valores das hemácias e da hemoglobina muito abaixo dos encontrados nestes casos tratados, pode haver sobrevivência do animal, entrando a infecção em latência. Isto demonstra que, pelo menos durante algum tempo, os animais podem viver com os valores mínimos encontrados no grupo tratado. Para uma anemia relativamente pouco intensa e instalada paulatinamente, como aquela observada neste grupo, ser capaz de levar à morte, seria necessário que tal estado se prolongasse por muito mais tempo do que aquele transcorrido entre a inoculação e a morte destes animais. Além disso, todos eles morreram com satisfatória reação reticulocitária, sinal evidente da atividade compensadora da medula óssea.

Estes fatos permitem concluir que a infecção das hemácias por trofozoítos, como ficou descrita na parte já publicada deste trabalho (1946), não é suficiente para explicar a morte dos animais tratados. A explicação deve ser buscada na intensa infecção exo-eritrocitária.

As observações a serem publicadas em continuação a este trabalho referir-se-ão às alterações histológicas encontradas no sistema nervoso central.

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

### 3. SOME ERYTHROCYTIC VALUES IN QUININE TREATED INFECTIONS

In a previous work (1946) it was demonstrated that chickens inoculated with erythrocytic forms of *P. gallinaceum* and given quinine from the day following inoculation onward die with massive exoerythrocytic blockage of the endothelial cells of the brain capillaries. Some trophozoites are seen in the red blood cells of these animals during the whole time between inoculation

and death, which were demonstrated to arise from the exoerythrocytic parasites. In these cases death was considered to be caused by the uncontrolled development of the endothelial schizonts, since the birds remain alive when treated with sulfadiazine, a drug definitely active against the exoerythrocytic forms.

Nevertheless, as the number of trophozoites poured into the blood increases slowly but constantly in the last days before death, it was found necessary to verify if death could be related by some way to the action of the erythrocytic trophozoites. In the present paper the results of the investigations on this subject are brought out.

The chickens used in this work were the same ones referred to in the previous paper (ns. 556 to 590). They were divided into two groups after inoculation: group A (10 birds) which served as control and group B (25 birds) which was given quinine.

Some erythrocytic values were determined in all of the animals before inoculation: number of erythrocytes, quantity of hemoglobin and volume of packed red cells. With the data thus obtained the erythrocytic constants were calculated: mean corpuscular volume, mean corpuscular hemoglobin and mean corpuscular hemoglobin concentration. These determinations and the reticulocyte count were repeated in the majority of the cases just before death. The results of this investigation are based on the comparison of the values obtained before the inoculation and at death.

The birds of group A (table 1) died between the 3rd and 5th days after inoculation. All six which were examined at the moment of death showed a very great decrease of all values but mean corpuscular volume and an intense reticulocyte response in those which died in the 4th and 5th days. The cause of their death was acute anemia.

The birds of group B (table 2) died between the 15th and 18th days after inoculation. They presented in most cases subnormal values at death. The number of reticulocytes was moderately increased in all the birds which were examined at death with the exception of two, in which the increase was very high.

The high mean corpuscular volume attained in some cases, chiefly in group A, must be related to the intense output of reticulocytes.

Increased phagocytosis as is known to exist in malaria, acting on trophozoite-parasitized and normal erythrocytes, is considered sufficient to justify the decrease of erythrocytic values in the treated cases. Even when

TABLE 1

NUMBER OF ERYTHROCYTES, VOLUME OF PACKED RED CELLS, QUANTITY OF HEMOGLOBIN AND CORPUSCULAR CONSTANTS, BEFORE INOCULATION AND AT DEATH, AND RETICULOCYTE COUNT AT DEATH, IN CHICKENS OF GROUP A, INOCULATED WITH *P. GALLINACEUM* AND UNTREATED.

BIRD N.	RED CELL COUNT (millions per c. mm.)		VOL. PACKED R. B. C. (cc. per 100 cc.)		HEMOGLOBIN (gm. per 100 cc.)		M. C. V. (c. $\mu$ )		M. C. H. ( $\gamma \gamma$ )		M. C. H. C. (%)		RETICULOCYTES (%)	DAY OF DEATH (after inoculation)
	B	D	B	D	B	D	B	D	B	D	B	D		
558.....	2.3	0.8	29	13	6.9	2.3	126	162	30	29	24	18	58	5th
559.....	2.0	0.6	29	10	6.3	1.6	145	167	31	27	22	16	40	5-
560.....	2.1	0.6	26	10	5.4	1.4	124	167	26	23	21	14	29	5-
562.....	2.5	0.9	31	12	7.7	2.0	120	133	30	22	25	17	12	3-
563.....	2.4	0.7	30	11	7.2	1.4	125	157	30	20	24	13	54	4-
565.....	2.1	0.5	25	10	6.3	1.4	124	200	30	28	24	14	60	5-

M. C. V., mean corpuscular volume.

M. C. H., mean corpuscular hemoglobin.

M. C. H. C., mean corpuscular hemoglobin concentration.

B, before inoculation.

D, moment of death.

TABLE 2

NUMBER OF ERYTHROCYTES, VOLUME OF PACKED RED CELLS, QUANTITY OF HEMOGLOBIN AND CORPUSCULAR CONSTANTS, BEFORE INOCULATION AND AT DEATH, AND RETICULOCYTE COUNT AT DEATH, IN CHICKENS OF GROUP B, INOCULATED WITH *P. GALLINACEUM* AND TREATED WITH QUININE.

BIRD N.	RED CELL COUNT (millions per c. mm.)		VOL. PACKED R. B. C. (cc. per 100 cc.)		HEMOGLOBIN (gm. per 100 cc.)		M. C. V. (c. $\mu$ )		M. C. H. ( $\gamma \gamma$ )		M. C. H. C. (%)		RETICULOCYTES (%)	DAY OF DEATH (after inoculation)
	B	D	B	D	B	D	B	D	B	D	B	D		
566.....	2.0	1.5	25	23	6.0	4.9	125	144	30	31	24	21	25	16th
567.....	2.5	2.4	29	27	7.4	5.7	116	112	30	24	25	21	11	16-
569.....	2.5	2.1	30	24	6.6	5.1	120	114	26	24	22	21	9	17-
571.....	2.1	2.2	27	27	6.0	4.6	128	123	28	21	22	17	14	16-
572.....	2.3	1.7	28	21	6.3	4.8	122	123	27	28	22	23	12	18-
573.....	2.3	1.6	30	22	7.4	5.2	130	137	32	32	25	24	16	17-
576.....	2.2	1.7	28	25	6.3	5.2	127	147	29	30	22	21	28	18-
577.....	2.1	1.6	25	22	6.3	5.0	119	137	30	31	25	23	16	17-
581.....	2.2	2.6	26	30	7.2	6.6	118	115	33	25	28	22	10	17-
583.....	2.8	1.6	33	20	7.7	3.8	118	125	27	24	23	19	13	16-
584.....	3.0	2.2	30	26	8.3	6.0	100	118	28	27	27	23	16	18-
585.....	2.0	2.0	23	24	6.3	6.3	115	120	31	31	27	26	15	17-
586.....	2.2	2.2	24	23	6.0	6.0	109	104	27	27	25	26	12	16-
587.....	2.6	2.1	29	25	7.1	4.8	111	119	27	23	24	19	9	17-
588.....	1.9	1.4	24	17	6.0	3.4	126	121	31	24	25	20	14	16-
589.....	2.5	2.1	30	25	7.3	5.7	120	119	29	27	24	23	13	17-

M. C. V., mean corpuscular volume.

M. C. H., mean corpuscular hemoglobin.

M. C. H. C., mean corpuscular hemoglobin concentration.

B, before inoculation.

D, at death.

a significant decrease of those numbers was observed, values so low as to be incompatible with life were never attained.

These results lead to the conclusion that the erythrocytic infection by trophozoites, as described in the preceding paper (1946), is not sufficient to explain the death of quinine treated animals. The explanation is to be found in the massive exoerythrocytic infection, as will be described in a further paper on the histological changes which occur in the central nervous system.

#### REFERÊNCIAS

PARAENSE, W. L.

1946. Ação patogênica das formas exoeritrocitárias do *Plasmodium gallinaceum*.  
1. Investigações preliminares. — 2. Prova terapêutica da ação patogênica.  
*Mem. Inst. Osw. Cruz* 44 (1) : 147-192.

WONG, S. Y.

1928. Colorimetric determination of iron and hemoglobin in blood. II. *Jour. Biol. Chem.* 77 (2) : 409-412.