

Estudos sôbre o ciclo exoeritrocitario do *Plasmodium gallinaceum*

por

W. Lobato Paraense

No presente artigo estão reunidos os resultados das investigações realizadas pelo autor em tórno do ciclo exoeritrocitário do *Plasmodium gallinaceum*. Alguns dêsses resultados acham-se já publicados, ao passo que outros ainda estão sendo desenvolvidos com maior minúcia para constituírem trabalhos independentes.

Se considerarmos os plasmodídeos sob o ponto de vista filogenético, veremos que êles se acham colocados um passo adiante dos hemoproteídeos na escala de adaptação ao hospedeiro vertebrado. De fato, os hemoproteídeos, instalados no organismo do vertebrado, realizam uma evolução esquizogônica no interior de células retículo-endoteliais, e os elementos daí resultantes invadem as hemácias, onde dão origem a gametócitos apenas. Ao passo que os plasmodídeos, além de repetirem essas mesmas etapas evolutivas, adquiriram a capacidade de se multiplicar nas hemácias. Esta complicação é o resultado de uma adaptação mais perfeita ao organismo do hospedador.

O raciocínio filogenético pode ser estendido ao próprio gênero *Plasmodium*. Então veremos, tanto quanto é possível analisar êste gênero com os conhecimentos atuais, que as espécies a êle pertencentes podem ser ordenadas em uma gradação evolutiva peculiar. Tomando como exemplos espécies entre as mais bem conhecidas, podemos figurar esta escala evolutiva com o *P. elongatum* na extremidade inferior, o *P. gallinaceum* na posição mediana e o *P. praecox* (*relictum*) na extremidade superior.

Isto justifica a preferência dedicada pelo autor ao *P. gallinaceum* para os seus estudos iniciais de malária experimental. Trata-se de uma espécie representativa de tódo o gênero, na qual os ciclos eritro e exoeritrocitário compõem e atuam de maneira equilibrada, permitindo melhor análise de suas mútuas relações.

EVOLUÇÃO DO ESPOROZOÍTO NO ORGANISMO DO VERTEBRADO

Depois de tentativas infrutíferas para observar a evolução dos esporozoítos em culturas de tecidos (1942), foram conseguidos resultados mais satisfatórios inoculando triturados de glândulas salivares infectadas no tecido subcutâneo (1943). Os fatos mais interessantes assinalados neste trabalho foram:

1. A constatação de parasitos no interior de células retículo-endoteliais, no local inoculado, durante o período de incubação, isto é, na ausência de infecção sanguínea.

2. O encontro de dois tipos de esquizogonias, sendo um constituído por elementos de núcleos volumosos e outro por elementos de núcleos muito menores, como está figurado na estampa que ilustra o referido artigo. Êstes esquizontes morfológicamente diversos foram assinalados também em um trabalho de Reichenow e Mudrow (1943), publicado simultaneamente, e denominados por êstes autores respectivamente macro e microesquizontes, dos quais derivam os macro e micromerozoítos.

Referindo-se às pesquisas feitas neste sentido, assim se expressou Wenyon (1945):

“Another important advance in the field of malaria has to do with the development of sporozoites of *Plasmodium gallinaceum* of chickens. As you know, this was the parasite in which James and Tate discovered the remarkable exoerythrocytic stages of development. As mosquitoes are easily infected with it, it seemed particularly suitable for the study of the development of sporozoites in fowls. A number of observers have attempted to trace this development with varying success. Of the earlier workers Reichenow and Mudrow in Germany, and Paraense in South America were the most successful, but it was left to Huff and Coulston to give the most complete account in their paper published at the end of 1944 of what happens to the sporozoite when it is injected into the chicken.”

As minhas observações sôbre a evolução do esporozoíto no ponto de inoculação foram publicadas em carater de nota preliminar. Continuei desenvolvendo

do este assunto, porém limitações de ordem material não permitiram a conclusão desse trabalho em tempo breve. Com a publicação do excelente artigo de HUFF e COULSTON ficou o problema resolvido em seu conjunto e em grande número de detalhes. Por isso retardei para tempo oportuno a divulgação dos meus resultados subsequentes.

Um aspecto interessante do ponto de vista morfológico é o aparecimento precoce, no local de inoculação, de dois tipos de esquizontes que se caracterizam pelas suas diferentes afinidades tintoriais. No mesmo preparado podem ser vistos elementos de citoplasma levemente basófilo, corado em azul claro pelo Giemsa, ao lado de outros cujo citoplasma apresenta um tom arroxeadado. A basofilia, nestas últimas formas, é muitas vezes tão acentuada que mal permite distinguir os grânulos nucleares sobre o fundo muito escuro do citoplasma. Esta diferenciação dos esquizontes exoeritrocitários nos dois tipos referidos mantém-se durante o curso ulterior da infecção. Por enquanto, não foi ainda possível explicá-la satisfatoriamente. Fato idêntico foi assinalado por ARAGÃO (1907) no seu primeiro trabalho sobre a evolução endotelial do *Haemoproteus columbae*. Supôs este autor que tal diversidade correspondesse à diferenciação sexual prematura dos futuros gametócitos.

Outro fato de observação precoce é o encontro de parasitos apresentando pequenos grânulos corados em tom violáceo escuro, muito semelhantes aos conhecidos grãos de volutina. Eles aparecem tanto no seio do citoplasma como superpostos aos núcleos. Podem existir em parasitos aparentemente normais, porém são vistos com certa frequência em formas alteradas, muitas das quais estão alojadas no interior de leucócitos heterófilos. Tenho encontrado muito raramente grânulos semelhantes a êsses em formas exoeritrocitárias aparentemente normais, no encéfalo de aves não tratadas. Talvez se trate de uma substância de natureza catabiótica, tendo em vista que aparece em parasitos mais ou menos profundamente alterados, como aquêles que residem nos granulócitos. O aparecimento frequente dessas granulações nas esquizogonias do local inoculado parece concordar com êste ponto de vista, porque reflete a mobilização das barreiras defensivas na porta de entrada do agente infeccioso. O número de esporozoítos diminui muito rapidamente em seguida à inoculação, indicando que grande parte dêles é destruída ao primeiro contacto com os tecidos do hospedador. A adaptação dos sobreviventes não será obtida sem a mortificação de alguns de seus elementos, principalmente evoluindo êles em células especializadas na função fagocitária.

A diferenciação dos descendentes dos esporozoítos em macro e micromerozoítos parece estabelecer-se depois de algumas gerações exoeritrocitárias. Ainda não me foi dado encontrar micromerozoítos até a 72.^a hora seguinte à

inoculação. Por outro lado, só depois deste prazo consegui evidenciar a infecção das hemácias pelos primeiros parasitos eritrocitários, por meio da subinoculação de sangue. Isto leva a crer que os micromerozoítos são as formas infectantes para as hemácias.

Durante todo o decurso ulterior da infecção persiste a diferenciação dos parasitos em ambos os tipos. Quando um animal inoculado com sangue parasitado é submetido a um tratamento intensivo e suficientemente prolongado com a quinina, de modo a evitar a infecção aguda pelas formas eritrocitárias, os elementos exoeritrocitários desenvolvem-se livremente até atingirem grande concentração. Neste momento são lançados ao sangue trofozoítos de origem exoeritrocitária, que invadem as hemácias e aí são logo destruídos pela quinina. O aspecto morfológico destes trofozoítos eritrocitários é absolutamente semelhante ao dos micromerozoítos bem diferenciados. Isto permite estabelecer a identidade entre ambos e insistir no tema de que os micromerozoítos são as formas exoeritrocitárias maduras, dotadas de capacidade infectante para as hemácias.

REVERSIBILIDADE DAS FORMAS ERITROCITÁRIAS

O encontro de formas retículo-endoteliais em aves inoculadas com sangue parasitado foi assinalado pelos primeiros autores que estudaram o ciclo exoeritrocitário. Para RAFFAELE isto seria devido à inoculação de formas exoeritrocitárias com o sangue injectado. No último trabalho deste autor, de que tenho conhecimento (1940), esta idéia ainda é defendida com exclusividade. Segundo ele, as formas exoeritrocitárias resultam sempre de outras formas análogas. De fato, a rotura das células endoteliais parasitadas deve lançar formas exoeritrocitárias à circulação sanguínea. Além disso, tais parasitos podem evoluir nos monócitos. Não é muito raro encontrar, ao exame microscópico do sangue, formas exoeritrocitárias nas condições referidas, principalmente nas infecções maciças. É óbvio que tais elementos podem ser retirados juntamente com o sangue, prosseguindo a sua evolução exoeritrocitária no animal subinoculado. Mas se lembrarmos que foram encontradas formas exoeritrocitárias em infecções iniciadas pela inoculação de uma única hemácia infectada, nas experiências de COULSTON e MANWELL (1941) com o *P. circumflexum*, devemos admitir a reversibilidade dos parasitos eritrocitários ao retículo-endotélio.

Neste particular, o comportamento dos diferentes plasmódios é variável. Enquanto em certas espécies (*gallinaceum*, *elongatum*, *cathemerium*, *circumflexum*, *durae*, *mexicanum* — esta última de lagartos), aparecem formas exo

em seguida à inoculação de sangue parasitado, em outras tal ocorrência nessas condições é muito rara (*praecox*, *juxtannucleare*, *nucleophilum*), observa-se apenas em determinados hospedeiros (*lophurae*) ou não se verificou de tódo até agora (*rouxi*, *hexamerium*, *oti*, *paddae*, *polare*, *subpraecox*, *vaughani*, etc.).

Quanto às malárias humanas e dos macacos, parece bem nítido que essa reversão apenas raramente acontece. Na prática da malarioterapia observa-se que, em geral, as infecções transmitidas com sangue parasitado são facilmente evitáveis e curáveis pela quinina, não dão recaídas e evoluem mais benignamente que os casos infectados por esporozoítos, sendo mesmo comuns as curas espontâneas. Estas constatações sugerem a ausência de formas exoeritrocitárias no organismo.

Está bem assentada a noção de que o ciclo exoeritrocitário no *P. gallinaceum* (também no *P. praecox*, no *P. cathemerium* e, a meu ver, em todos os outros plasmódios) segue-se imediatamente à inoculação de esporozoítos. Quanto aos casos infectados com sangue parasitado, sabe-se que nas espécies em que êle se desenvolve o seu aparecimento é tardio e só se verifica depois de transcorrido um período de vários dias de infecção eritrocitária. Admite-se geralmente que durante êste período processa-se uma readaptação das formas eritrocitárias ao retículo-endotélio.

Segundo os resultados por mim obtidos, quando se inoculam formas eritrocitárias o ciclo exoeritrocitário instala-se imediatamente, a partir de parasitos contidos em hemácias fagocitadas logo em seguida à inoculação. O prazo decorrido até o aparecimento das formas exoeritrocitárias é sempre aquêle necessário para que o parasitismo atinja uma intensidade compatível com a sua fácil evidenciação.

Os meus resultados a êste respeito são conseguidos em condições especiais. São inoculadas aves com menos de 10 dias de idade, por via intramuscular ou intravenosa (quase sempre pelo último processo) e poucas horas depois é iniciado o tratamento. A quinina é administrada sob a forma de cloridrato, por via oral, na dose diária de 150 mg por Kg do corpo, até que sobrevenha a morte do animal. Esta ocorre praticamente em todos os casos, em tempo variável conforme o número de parasitos injetados e a via de inoculação, mas nunca inferior a 10 dias, nas minhas observações. A morte resulta, como será visto depois, da oclusão dos capilares do sistema nervoso central pelas esquizogonias que se desenvolvem nas células endoteliais. Resultados idênticos são obtidos mesmo quando os animais são submetidos à quininizacão prévia, antes de serem inoculados.

Em muitos dêstes casos não está excluída a possibilidade de terem sido injectadas formas exoeritrocitárias. Muitas vêzes, entretanto, isso não deve ocorrer, porque o material infectante provém de aves também inoculadas com sangue e cuja infecção está apenas no início. Nestes casos os parasitos endoteliais não são ainda tão abundantes a ponto de passarem em pequenas quantidades de sangue e estarem presentes em tôdas as parcelas do material inoculado.

Quando se faz o tratamento precoce de pintos inoculados com o *P. lophurae*, a infecção é aparentemente esterilizada. Isto porque as formas eritrocitárias do *P. lophurae* não regridem ao ciclo exoeritrocitário naqueles animais, se bem que sejam patogênicas para êles. Isto mostra que o tratamento pela quinina é suficiente para debelar o parasitismo das hemácias e que nos casos tratados precocemente a infecção pelo *P. gallinaceum* persiste à custa de formas eritrocitárias, fagocitadas pelas células retículo-endoteliais, que retomaram imediatamente a qualidade exoeritrocitária.

Não me parece que nos animais tratados a regressão ao SRE deva ser explicada pela existência de condições desfavoráveis no sangue circulante, no caso a ação da quinina. Isto porque o ciclo exoeritrocitário comparece também, e simultaneamente, nos animais não tratados que resistem por mais alguns dias à infecção sanguínea aguda. Em vista desta mesma simultaneidade, parece possível afirmar que, nestes últimos casos, o desenvolvimento de anticorpos não explica a regressão em causa.

CARACTERÍSTICAS GERAIS DA INFECÇÃO TRATADA COM QUININA

Neste capítulo serão referidas somente as observações feitas em aves inoculadas com parasitos eritrocitários dentro dos primeiros 10 dias de vida. Não possuo ainda, neste assunto, um registro satisfatório de infecções em maiores idades ou iniciadas com esporozoítos.

Enquanto os animais inoculados com forte dose de parasitos (cêrca de 50.000.000) e não tratados morrem devido ao incremento da infecção sanguínea, geralmente dentro dos 10 primeiros dias seguintes à inoculação, aquêles que são submetidos à terapêutica precoce ultrapassam de muito êste período. Nestes últimos a parasitemia se mantém em nível subpatente durante certo número de dias, para depois tornar-se mais evidente. Em tôrno do 10.º dia os elementos eritrocitários aparecem com frequência relativamente maior. São representados quase exclusivamente por trofozoítos. Quando são encontrados elementos mais evoluídos, trata-se quase sempre de esquizontes jovens, em

fase de divisão inicial, sendo excepcional o achado de formas de divisão mais avançada.

Quando se deixam transcorrer dois ou três dias antes de iniciar a terapêutica, assiste-se a destruição dos parasitos, sob a ação da quinina, com maior nitidez porque a infecção já está mais adiantada. No 2.º dia do tratamento aparecem alterações regressivas na maioria dos esquizontes eritrocitários de qualquer fase evolutiva. Estas alterações consistem principalmente em vacuolização do citoplasma e fenômenos de cariorrexe e cariólise. Os trofozoítos parecem oferecer maior resistência, pois não apresentam a princípio alterações bastante nítidas. Os gametócitos são os últimos a se apresentarem visivelmente alterados, mas acabam também por ser destruídos e desaparecer definitivamente.

Após uns 10 dias de tratamento começam a aparecer trofozoítos nas hemácias, a princípio em número muito reduzido (cêrca de 0.1% ou seja 1 parasito em 1000 hemácias). Êstes trofozoítos não chegam quase a crescer e por isso nunca se multiplicam, visto como são atacados pela quinina. O seu número, porém, aumenta gradualmente nos três ou quatro dias subsequentes, até atingir, em muitos casos, mais de 20%. Então ocorre a morte dos animais, em consequência da infecção exoeritrocitária maciça dos endotélios dos capilares do sistema nervoso central.

Os trofozoítos encontrados nas hémácias resultam, sem nenhuma dúvida, das formas exoeritrocitárias. Examinando simultaneamente o sangue e o cerebro de animais nessas condições, pode-se verificar essa estreita dependência. O material de cérebro é obtido por meio de punções cranianas feitas diariamente, ao mesmo tempo que se retira sangue periférico para contagem dos trofozoítos. A avaliação numérica da infecção exoeritrocitária é feita pela contagem de segmentos de capilares infectados que aparecem nos preparados, e expressa em forma percentual. A princípio, quando ainda é muito baixo o número de formas exoeritrocitárias, são também pouco frequentes as hemácias parasitadas. Mas depois, à medida que aumenta rapidamente a infecção endotelial, vai subindo também o número de trofozoítos. No dia da morte dos animais são geralmente encontrados cêrca de 90% de capilares parasitados, sendo sempre muito menor a percentagem de formas eritrocitárias (cêrca de 20%).

A representação gráfica, se traçada em forma semilogarítmica, revela a existência de nítido paralelismo entre as curvas da parasitemia e da infecção endotelial (1946).

Para reforçar a idéia de que as formas encontradas nos glóbulos vermelhos, nos casos tratados, são resultantes dos merozoítos exoeritrocitários, concorre, além disso, a absoluta semelhança morfológica existente entre os merozoítos exoeritrocitários maduros (micromerozoítos) e os trofozoítos das hemácias. Este aspecto acha-se ilustrado no meu trabalho de 1946.

AÇÃO PATOGÊNICA DAS FORMAS EXOERITROCITÁRIAS

No capítulo precedente ficou visto que, nos animais jovens tratados com quinina após a inoculação de sangue parasitado, desenvolve-se intensa infecção exoeritrocitária, que provoca a morte do hospedador. Isto indica, portanto, a existência de nítida ação patogênica das formas endoteliais.

Se as aves são tratadas em tempo com sulfadiazina ou paludrina, a morte é retardada por um período significativo, que varia segundo a duração do tratamento e a fase da infecção na qual este é iniciado.

Quando as aves são tratadas exclusivamente com quinina, o aparecimento de trofozoítos em número crescente nas hemácias é o primeiro sinal que indica a aproximação do dia da morte. Pelo 12.^o dia após a inoculação, ou pouco depois, o número de trofozoítos acha-se em torno de 1%. Nenhum sinal exterior de moléstia observa-se então, mas a partir daí a ave não sobrevive geralmente mais de 3 a 4 dias.

Os sintomas mórbidos consistem a princípio em sonolência, que se acentua levando o animal, mais ou menos rapidamente, ao estado comatoso.

Foram feitas observações de controle para determinar se o emprego da quinina, como é feito nesses casos, poderia ter alguma influência no desenvolvimento dos sintomas referidos. Os resultados foram absolutamente negativos (1946).

As alterações encontradas no sistema nervoso central são de natureza vascular e celular.

Do ponto de vista vascular, as modificações provocadas pelas formas exoeritrocitárias decorrem da presença dos parasitos no interior das células endoteliais dos capilares, onde se reproduzem intensivamente. Desta proliferação resulta progressivo aumento de volume dos parasitos e, em consequência, também das células continentas. A superfície livre destas células salienta-se na direção do eixo do vaso, cuja luz é finalmente obliterada. O tratamento pela quinina permite que a vida do animal se prolongue pelo tempo necessário à extensão do parasitismo a quase todo o sistema capilar.

A obliteração do canal vascular é vista claramente nos cortes transversais dos capilares, podendo ser reconstituída a sua marcha progressiva.

São óbvias as consequências das alterações que ficaram descritas. A decorrência mais imediata é a supressão da corrente circulatória no território banhado pelo segmento distal do capilar. A difusão do parasitismo pelas células endoteliais é tão ampla que permite acreditar na existência de um vasto processo isquêmico afetando a maioria da substância nervosa. Neste particular, o fechamento da luz vascular constitui um fator patogênico de ordem mecânica análogo ao que se observa nas formas comatosas da malária humana perniciosa (*P. falciparum*). A diferença é que, no caso do *P. falciparum*, o obstáculo é representado por êmbolos formados pela aglutinação de hemácias parasitadas. Ao passo que na infecção pelo *P. gallinaceum* os glóbulos vermelhos parasitados não têm aumentada a sua aglutinabilidade, sendo o obstáculo causado pelas células endoteliais extremamente tumefeitas.

A presença das esquizogonias no interior das células endoteliais é um fator capaz, por si só, de provocar a alteração das referidas células. Mas nas regiões isquemiadas deve comparecer ainda outra causa de alteração, que é a anoxia das mesmas células endoteliais. Estes fatores comprometem a integridade da barreira hematoencefálica, aumentando a permeabilidade dos capilares e permitindo assim a passagem de líquido para os tecidos, através de suas paredes.

A substância nervosa, nestes casos, apresenta-se pontilhada de petéquias formadas em torno dos capilares parasitados. No mecanismo de formação destas petéquias deve ser levada em conta a diapedese de eritrócitos através dos endotélios lesados. Mas por outro lado existem focos hemorrágicos nitidamente relacionados à rotura das paredes vasculares. Esta última possibilidade deve decorrer do aumento da pressão sanguínea nas porções proximais dos vasos obliterados, cujos endotélios já se encontram alterados pelos parasitos.

Para o lado das células nervosas observa-se, como resultado da supressão circulatória, o quadro citológico da anoxia, apreciável sobretudo nas células de Purkinje do cerebelo. Estas apresentam alterações mais ou menos profundas, com dissolução progressiva da substância cromófila. Estas células, que sob o ponto de vista da disposição dos grânulos cromófilos pertencem ao tipo esticocrômico, mostram o citoplasma vazio, com os últimos remanescentes dos grãos de Nissl acolados à periferia. A célula dá assim a impressão de estar revestida por grossa membrana. Com o progredir do processo alterativo, vai se desvanecendo a textura da célula, cujos contornos acabam por se

tornar angulosos e denticulados. Finalmente, ao ser atingida a última etapa da lesão isquêmica, o elemento aparece como um bloco de substância homogênea em cujo centro distingue-se uma sombra mais fortemente corada que é o vestígio do núcleo.

Este tipo de lesão, como se sabe, pode ser também encontrado em casos fatais de malária *falciparum* (tipo comatoso). Já foi visto que, em ambos os exemplos, estas consequências têm uma causa comum, que é a obliteração vascular, diferindo apenas a maneira como esta obliteração se processa.

Entretanto certos autores modernos mostram-se tendentes a admitir, na malária comatosa, a inexistência de êmbolos de hemácias parasitadas durante a vida. Segundo eles a anemia grave provocada pelo plasmódio, com a consequente deficiência respiratória do sangue (anoxemia), bastaria para explicar o quadro histopatológico encontrado nesses casos.

Apesar de ter sido evidenciada sem qualquer dúvida, nos casos descritos neste capítulo, a obliteração dos capilares do sistema nervoso central, foram feitas determinações hematológicas em numerosos animais, antes da inoculação e posteriormente em momento muito próximo da morte. A comparação dos resultados mostrou a existência de certa anemia em quase todos os casos. Entretanto os valores encontrados nas proximidades da morte, nesses animais caídos em coma, achavam-se dentro ou pouco abaixo dos limites inferiores da normalidade. (A determinação dos valores normais foi feita no trabalho de 1946).

Mesmo nos casos em que a anemia foi mais intensa, não foram atingidos valores incompatíveis com a vida. Nos ataques agudos muito intensos, que levam os valores hematológicos dos eritrócitos ainda abaixo do mínimo encontrado nos casos que estão sendo agora considerados, pode haver sobrevivência do animal, entrando a infecção em latência. Isto demonstra que, pelo menos durante certo tempo, as aves podem viver com tais valores. Para uma anemia relativamente pouco profunda, como aquela observada nos casos tratados, 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 boa reação reticulocitária, sinal evidente da atividade compensadora da medula óssea.

Esta anemia pouco intensa não é estranhável, visto que corresponde ao parasitismo relativamente baixo das hemácias pelos trofozoítos. Ela deve ser atribuída à destruição dos glóbulos parasitados em consequência da ação fagocitária das células do SRE. De fato, o exame das vísceras de maior importância retículo-endotelial (fígado e baço), em todos os animais tratados, re-

velou a existência de grande atividade espodofágica, principalmente da parte dos elementos endoteliais 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. Também existe pigmento no interior dessas células, porém em quantidade muito reduzida, sob a forma de grânulos muito delicados como são aqueles encontrados nos trofozoítos apenas em início de crescimento. É compreensível que a hemácia, invadida por um parasito, sofra considerável alteração na sua estrutura físico-química, suficiente para transformá-la em um elemento anormal sujeito a ser removido do meio sanguíneo. No mecanismo desta remoção entra como fator de grande importância a atividade fagocitária do SRE. Atualmente ainda não se considera provado que a fagocitose seja o meio normal de destruição destes elementos (Wintrobe, 1942). Quanto à hemácia atacada pelo plasmódio, entretanto, desde os longínquos trabalhos da velha escola italiana sabe-se que ela é englobada pelas células fagocitárias. O encontro dos finos grânulos de pigmento oriundos dos trofozoítos apreendidos juntamente com as hemácias por eles parasitadas, e por outro lado o número de reticulócitos existentes no sangue circulante, são indícios morfológicos seguros da destruição globular no material desta experiência.

Nos animais não tratados as determinações feitas no momento da morte estiveram sempre abaixo dos seguintes valores: para as hemácias, 800.000 por mm³; para a hemoglobina, 1.7g por 100 cm³; para o hematócrito, 13%.

Nos animais tratados os números mínimos obtidos foram: para as hemácias, 1.400.000 por mm³; para a hemoglobina, 3.4g por 100 cm³; para o hematócrito, 15%.

Em animais que escaparam à infecção aguda foram registrados valores como os seguintes: hemácias, 1.200.000 por mm³; hemoglobina, 3.1 g por 100 cm³; hematócrito, 19%.

As aves que morrem de infecção aguda apresentam sempre, além das lesões celulares devidas à anoxemia, alterações macroscópicas típicas, a saber: intensa melanemia e anemia visceral, naturalmente acompanhadas de profunda melanose dos órgãos. Estes aspectos macroscópicos não são observados nas aves mortas na vigência do tratamento.

Todos estes fatos permitem concluir que a infecção das hemácias por trofozoítos, como ficou descrita, não é suficiente para explicar a morte dos animais tratados. A explicação deve ser buscada na intensa infecção exoeritrocitária.

OBSERVAÇÕES TERAPÊUTICAS

No trabalho de 1946 estão figuradas as principais etapas da destruição das formas exoeritrocitárias pela sulfadiazina. Este medicamento foi utilizado para demonstrar a ação patogênica das referidas formas nas infecções tratadas com quinina. A destruição das esquizogonias endoteliais, não permitindo que estas obstruam a luz vascular, evita a morte das aves assim tratadas. Suprimida a aplicação da sulfadiazina, as formas exoeritrocitárias reiniciam a sua proliferação a partir de elementos residuais, que escapam à ação medicamentosa, e provocam a morte se não é feito novo tratamento com a sulfa.

A dose de sulfadiazina utilizada nestas experiências foi de 1g por Kg do corpo do animal, aplicada de 12 em 12 horas, por via oral.

Ulteriormente foram feitas observações no mesmo sentido com a paludrina, tendo sido obtidos resultados semelhantes. A dose empregada foi de 75 mg por Kg do corpo, via oral, uma vez por dia.

Quando se faz o tratamento pela quinina, em casos inoculados com sangue parasitado, segundo as normas descritas em um dos capítulos anteriores, pode-se evitar a morte dos animais com a administração da sulfadiazina ou da paludrina. Ambas as substâncias atacam as formas exoeritrocitárias, produzindo alterações morfológicamente semelhantes. Observa-se, entretanto, que a ação da paludrina é sensivelmente mais rápida que a da sulfa, provocando nos parasitos lesões idênticas em tempo mais breve.

Só quando a parasitação dos endotélios atinge um limiar muito alto, acima de 80%, as duas substâncias tornam-se incapazes de evitar a morte. Isto é devido ao estabelecimento de lesões irreversíveis na célula nervosa, agravadas pela permanência dos esquizontes nas células endoteliais. Mesmo utilizando a paludrina, que paralisa mais rapidamente a evolução destes esquizontes, eles não são imediatamente removidos e continuam constituindo embaraço à circulação sanguínea. Nestes casos os animais já apresentam cerca de 20% de trofozoitos nas hemácias, estão atacados da sonolência que precede a morte e não resistem mais de 24 horas em seguida ao início do tratamento pela paludrina, mesmo quando esta é administrada com intervalo de 12 horas.

Com a dose referida, aplicada uma vez por dia, não consegui esterilizar a infecção em 20 aves tratadas com quinina e em seguida com paludrina. Nesta experiência, iniciada pela inoculação de sangue parasitado, foi administrada a quinina até que o número de trofozoitos nas hemácias atingiu entre 1 e 5%. Nessa ocasião a intensidade máxima da infecção endotelial era de 15%. Foi então suspensa a quinina e logo em seguida iniciado o tratamento pela palu-

drina. As formas exoeritrocitárias foram rapidamente atacadas, refletindo-se esta ação na baixa, imediata do número de trofozoítos, que no 4.º dia do tratamento não eram mais encontrados ao exame microscópico, na grande maioria dos casos. O tratamento pela paludrina prolongou-se durante 8 dias. Transcorridos mais 8 dias o exame microscópico do sangue de todas as aves revelou que a infecção sanguínea estava novamente instalada. Este novo ataque agudo provocou a morte de todas as aves, que também apresentaram infecção endotelial de intensidade variável conforme o tempo de sobrevivência à reativação do parasitismo.

Quando a administração da paludrina é feita depois do tratamento pela quinina, os trofozoítos existentes nas hemácias apresentam-se alterados e desaparecem, em consequência da ação da paludrina sobre eles e principalmente sobre as formas exoeritrocitárias que os produzem. Entretanto, alguns desses trofozoítos mantêm-se ainda por alguns dias e chegam a crescer, diferenciando-se em gametócitos para desaparecerem definitivamente em seguida. Este fato, além de demonstrar que a paludrina não impede a formação dos gametócitos e que a sua ação contra estes é mais tardia que contra todas as outras formas, vem confirmar a noção de que os gametócitos, pelo menos em parte, podem evoluir diretamente a partir da esquizogonia exoeritrocitária. Isto, aliás, não é de admirar, visto como os gametócitos dos hemoproteídeos têm a sua origem exclusivamente nos merozoítos do ciclo endotelial.

A formação dos gametócitos não se processa sob a ação da quinina, donde se conclui que eles são sensíveis a este medicamento desde a fase indiferenciada de trofozoíto.

A atividade da paludrina sobre os parasitos eritrocitários não será considerada neste trabalho. Citarei apenas o resultado de algumas experiências feitas com o propósito de verificar até que ponto poder-se-ia deixar subir a parasitemia sem provocar a morte, antes de atacar com a paludrina. Com exceção de poucos, a maioria dos casos em que a parasitemia ultrapassou 100% (100 parasitos em 100 hemácias) não resistiu à infecção, apesar de ter sido iniciada nesse momento a terapêutica. Alguns animais entretanto puderam esperar os efeitos do tratamento e escaparam ao ataque agudo. Entre estes havia vários cuja parasitemia alcançava cerca de 150%. Cada ave recebeu apenas 3 doses, com intervalos de 12 horas. Ao fim de 20 horas de tratamento, o número de parasitos havia caído consideravelmente, achando-se quase todos alterados. Daí em diante a parasitemia decresceu progressivamente até níveis muito baixos, para depois recrudescer e complicar-se com intensa infecção endotelial, provocando a morte dos animais.

A ação da paludrina sobre as formas eritrocitárias faz lembrar a da quinina. É entretanto muito mais violenta, provocando rápida lise dos parasitos e alterando mais tardiamente os gametócitos, que podem persistir por alguns dias. Sustada a evolução dos parasitos, a fagocitose que na malária é intensamente exacerbada encarrega-se de remover as hemácias infectadas com plasmódios alterados, causando a diminuição gradual mas constante da parasitemia.

Os trabalhos que tenho lido sobre a paludrina não dizem quais as doses utilizadas na experimentação em aves. Talvez nos meus casos acima referidos tivesse sido possível esterilizar as infecções usando outras doses, aplicadas com intervalos adequados. Por enquanto, pois, só me é dado apresentar resultados de natureza qualitativa. Considero esses resultados aplicáveis ao problema da profilaxia medicamentosa, pois este problema é idêntico ao do ataque às formas exoeritrocitárias. As questões da terapêutica das formas exoeritrocitárias e da profilaxia medicamentosa podem ser teoricamente fundidas em uma única. Assim sendo, tanto faz estudar o comportamento, ante os medicamentos, das formas exoeritrocitárias existentes durante o período de incubação como o daquelas que aparecem em qualquer outro período da infecção, pois elas diferem entre si apenas quanto à cronologia do seu aparecimento.

Do ponto de vista essencialmente profilático possuo poucas observações, tendo conseguido evidenciar nas esquizogonias do local de inoculação de esporozoítos as mesmas alterações já assinaladas nos parasitos dos endotélios vasculares do sistema nervoso central.

O CICLO EXOERITROCITÁRIO E A IMUNIDADE

Em 1914, Sergent e Béguet publicaram interessante trabalho sobre a re-infecção, com o *Haemoproteus columbae*, de pombos curados espontaneamente de infecção anterior. Estes autores trabalharam com duas aves que tinham permanecido infectadas durante quatro anos, e que durante outros quatro anos não apresentaram parasitos no sangue. Comparando os seus resultados com aqueles obtidos por outros autores que utilizaram o *P. praecox* em pesquisas semelhantes, admitiram que, em vários grupos de hemosporídeos, não haveria imunidade relativa (premunição) nos casos em que a infecção se tornasse crônica.

Para Sergent e Béguet, esses resultados indicavam a importância do estudo dos hemoproteus, tanto quanto dos plasmódios, na elucidação de problemas de malária humana. A razão que na época assistia a estes autores torna-

se hoje ainda mais incontestável, depois da descoberta do ciclo exoeritrocitário dos plasmodídeos. Êste ciclo, como é sabido, corresponde à fase endotelial do desenvolvimento dos hemoproteídeos. Assim, a distinção entre as duas famílias de hematozoários, segundo os conhecimentos atuais, repousa apenas na esquizogonia eritrocitária, existente nos plasmodídeos e ausente nos hemoproteídeos. Do ponto de vista filogenético, conforme ficou dito em um capítulo anterior, devemos considerar os plasmodídeos como sêres derivados dos hemoproteídeos em virtude de uma adaptação mais completa ao meio sanguíneo.

Com o pensamento nestes fatos de ordem filogenética foi que, em um artigo sôbre a evolução dos plasmódios no retículo-endotélio (abril 1945), teci alguns comentários a respeito da significação biológica do ciclo exoeritrocitário. Escrevi então que, não sendo o hemoproteus capaz de provocar imunidade, a imunidade na malária deve ser atribuída à esquizogonia eritrocitária:

“Talvez se demonstre algum dia que os processos imunitários na malária sejam estimulados apenas pelos parasitos assexuados das hemácias”.

No decurso de investigações subsequentes (1946), tive oportunidade de assinalar certos fatos observados em alguns dos animais utilizados nesses trabalhos. Eram aves que, dominada a fase aguda da parasitemia, morriam vários dias depois, quando a infecção das hemácias encontrava-se em franco declínio ou quando já tinha sido ultrapassado êsse período de declínio que sucede à fase aguda. Nestes casos os parasitos sanguíneos, a partir da crise que precede a latência, passavam a ser representados cada vez mais exclusivamente por trofozoítos, e em vários casos somente êstes eram presentes. Decorridos alguns dias, a curva parasitêmica entrava novamente em ascensão, desta vez à custa apenas de trofozoítos, morrendo os animais com infecção exoeritrocitária maciça. Nestes últimos casos, a sucessão dos fatos observados a partir da crise parasitêmica era muito semelhante às ocorrências assinaladas nos animais tratados com quinina, salientando-se a ausência de multiplicação dos trofozoítos.

Entre os comentários feitos a propósito dêsses resultados, transcrevo aqui os seguintes :

“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. 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.”

.....

“A consideração destes fatos leva a crêr 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.”

Constatações idênticas foram feitas, ainda nesse trabalho, em aves que apresentaram recrudescência da parasitemia após um período de latência. A estes casos foram aplicadas as mesmas considerações que acabei de transcrever.

Durante o tempo transcorrido entre a divulgação dos meus dois trabalhos referidos, tive oportunidade de conhecer as excelentes pesquisas de Huff e Coulston já citadas (dezembro 1944). Entre as figuras que ilustram o artigo referido estão algumas que mostram esquizogonias exoeritrocitárias desenvolvidas no local da inoculação de esporozoítos, em aves imunizadas por infecção anterior. No texto desse artigo não há referências a tal fato, mas em nota publicada ulteriormente (abril 1946) os mesmos autores fazem um estudo especial da questão. Aqui é demonstrada a evolução completa dos parasitos inoculados (*P. gallinaceum* e *P. praecox*), desde a fase de esporozoíto até a de trofozoíto eritrocitário, em aves imunes. Neste último trabalho tal evolução é realizada não só em aves naturalmente susceptíveis que apresentam imunidade adquirida, como também em aves de espécies dotadas de imunidade natural para os parasitos inoculados. Terminada a evolução pre-eritrocitária, os trofozoítos que são lançados ao sangue vão sendo removidos da circulação.

Dêsse modo as minhas observações e as de Huff e Coulston concorrem, por caminhos diferentes, para o mesmo resultado: a demonstração de que os efeitos da imunidade não se fazem sentir sobre os parasitos exoeritrocitários.

Nos últimos meses tenho procurado desenvolver os meus trabalhos anteriores sobre este assunto, procurando padronizar um método que permita obter com maior constância infecções com as características acima referidas. Isto pode ser conseguido com certa frequência inoculando pequena dose de parasitos eritrocitários em aves cuja idade não seja tão baixa a ponto de se desenvolver infecção aguda mortal, nem tão alta que a torne resistente ao parasitismo.

Sempre que isto é conseguido a parasitemia ascende lentamente, de modo que ao ser atingido o ápice da curva dos parasitos já se acha eficientemente mobilizado o mecanismo imunitário. A infecção entra em crise e, ao ser atingido certo nível muito baixo (cêrca de 1%) a parasitemia se mantém à custa de trofozoítos. O número dêstes começa depois a aumentar, como ficou descrito nos casos tratados com quinina, até que morre o animal com intensa infecção exoeritrocitária.

REFERENCIAS

ARAGÃO, H. B.

1907. Sobre o cyclo evolutivo do halteridio do pombo. *Brazil-Medico* 21 (15) : 141-142; *ibidem* 21 (31) : 301-303.

COULSTON, F. e R. D. MANWELL

1941. Single-parasite infections and exoerythrocytic schizogony in *Plasmodium circumflexum*. *Amer. Jour. Hyg.* 34 (2) Sec. C : 119-125.

HUFF, C. G. e F. COULSTON

1944. The development of *Plasmodium gallinaceum* from sporozoite to erythrocytic trophozoite. *Jour. Inf. Dis.* 75 (3) : 231-249.

1946. The relation of natural and acquired immunity of various avian hosts to the cryptozoites and metacryptozoites of *Plasmodium gallinaceum* and *Plasmodium relictum*. *Ibidem* 78 (2) : 99-117.

PARAENSE, W. L.

1943. Aspectos parasitários observados no local inoculado com esporozoítos de *Plasmodium gallinaceum*. *Mem. Inst. Osw. Cruz* 38 (3) : 353-359.

1945. Sobre a evolução dos plasmódios no retículo-endotélio. *Med. Cir. Farm.* 108 (abril) : 187-212.

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.

PARAENSE, W. L., H. MEYER e V. MENEZES

1942. Estudos sobre "*Plasmodium gallinaceum*". Comportamento dos esporozoítos em cultura de baço embrionário *Rev. Bras. Biol.* 2 (1) : 89-94.

RAFFAELE, G.

1940. Ulteriori ricerche sulla fase monogonica primaria dei plasmodidi nell'uomo e negli uccelli. *Riv. Malariol.* 19 (4) : 193-225.

REICHENOW, E. e L. MUDROW

1943. Der Entwicklungsgang von *Plasmodium praecox* in Vogelkörper. *Deut. Tropenmed. Ztschr.* 47 (12) : 289-299.

SERGENT, EDM. e 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. R. Soc. Biol.* 77 (1) : 21-23.

WENYON, C. M.

1945. Tropical medicine in war and peace. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 39 (3) : 177-194.

WINTROBE, M. M.

1942. *Clinical Hematology*. Lea & Febiger, Philadelphia.