

Aspectos parasitários observados no local inoculado com esporozoitos de *Plasmodium Gallinaceum* (*)

(Nota preliminar)

por

Lobato Paraense

(Divisão de Estudos de Endemias)

(Com 1 estampa colorida)

Uma das questões de malariologia cuja solução vem sendo há muito procurada, é a que se refere ao destino imediato do esporozoito quando posto em contacto com os tecidos do hospedeiro vertebrado pela picada do mosquito.

As diferenças de aspecto existentes entre os esporozoitos e os esquizontes jovens das hemátias levaram Grassi (1901) a negar que os primeiros esquizontes a invadirem o sangue derivassem diretamente dos esporozoitos. Segundo Grassi, os esporozoitos inoculados pelo mosquito multiplicar-se-iam no organismo humano, dando origem a uma geração dotada de caracteres particulares que estaria relacionada com o início da incubação. Observando-se o esquema desse autor compreende-se que êle, ao escrever a sua monografia sobre a malária, duvidava que os esporozoitos fossem dotados de capacidade infectante para as hemátias. Esta propriedade surgiria com a geração derivada dos esporozoitos, já no fim da incubação, aparecendo então os primeiros glóbulos vermelhos parasitados.

Antes de ser conhecido o trabalho de Schaudinn (1903) sobre o *Plasmodium vivax*, outros pesquisadores tinham feito tentativas improfícuas para observar a penetração dos esporozoitos da malária nos glóbulos vermelhos. No referido trabalho é descrita essa penetração de maneira tão detalhada que parece não haver dúvida quanto à realidade do fenômeno. Entretanto, por motivos inexplicáveis, essa experiência nunca mais pode ser reproduzida, mesmo por pesquisadores que seguiram à risca a técnica original.

Em 1931 James, comentando as diferenças observadas na prática da malarioterapia entre os casos infectados por inoculação de sangue e aqueles infectados por picada de mosquitos, relativamente à eficácia da quinina e à in-

* Recebido para publicação a 1 de abril e dado à publicidade em junho de 1943.

cidência das recaídas, emitiu duas hipóteses para a explicação dessas diferenças. Uma delas foi a seguinte: os esporozoitos, em vez de entrarem nos glóbulos vermelhos, penetrariam nas células do tecido conjuntivo ou nas que revestem os capilares sanguíneos, aí permanecendo até à rotura destas células, alguns meses depois.

Efetivamente, poucos anos mais tarde começaram a ser evidenciados aspectos parasitários até então desconhecidos, consistindo em esquizogonias desprovidas de pigmento, localizadas no interior de células do sistema reticulo-endotelial, em casos de malária com infecção sanguínea comprovada. Estudos posteriores demonstraram que estas esquizogonias apigmentadas pertenciam ao ciclo evolutivo dos plasmódios (ciclo exoeritrocitário).

Atualmente podem-se contar algumas centenas de trabalhos escritos sobre o assunto, mas, não obstante o grande número de pesquisas já realizadas a respeito, ainda aguardam solução inúmeros problemas levantados pela nova descoberta.

Um desses problemas relaciona-se com o momento em que surgem as formas exoeritrocitárias no decurso da infecção malárica. Para certos autores o esporozoito, uma vez inoculado, realiza imediatamente a esquizogonia exoeritrocitária (fase monogônica primária). Para outros o ciclo exoeritrocitário só se realiza depois de estabelecida a infecção sanguínea.

Com o fito de contribuir para o esclarecimento dessa questão, iniciei há algum tempo uma série de pesquisas, tentando observar o comportamento dos esporozoitos em cultura de baço embrionário (1942). Foram colocados esporozoitos de *Plasmodium gallinaceum* em contacto com fragmentos de baço de embriões de galinha cultivados segundo o método de Carrel em gota pendente. As experiências foram repetidas numerosas vezes, não tendo sido possível observar qualquer sinal de evolução dos esporozoitos, fora ou dentro das células esplênicas.

Em vista do insucesso dessas experiências decidi valer-me de outro método, cujas condições fossem as mais próximas possível das naturais. Assim consegui os resultados que serão relatados nesta nota.

As pesquisas tiveram início há um ano, porém fui obrigado a interrompê-las durante os sete últimos meses por motivo irremovível, o que me impede talvez de trazer uma contribuição mais completa. Entretanto, os trabalhos serão logo retomados e espero poder brevemente publicar resultados definitivos.

★

★ ★

Tenho utilizado nestas pesquisas o *Plasmodium gallinaceum*, inoculando-o no estágio de esporozoito em pintos normais.

Inicialmente são alimentados grandes lotes de mosquitos *Aedes ægypti* (criados no laboratório) em frangos portadores de numerosos gametocitos maduros. Depois do repasto infectante os mosquitos são alimentados com xarope simples, até aparecerem esporozoitos nas glândulas salivares, o que geralmente ocorre a partir do 10.^o dia. Então é feita a inoculação em pintos normais, conservados ao abrigo de hematófagos.

Em alguns casos a inoculação é feita por injeção subcutânea de triturado das glândulas salivares, em água fisiológica. A retirada das glândulas é feita em temperatura ambiente, e o contacto dos esporozoitos com a solução fisiológica é de curta duração (cerca de 5 minutos), apenas o suficiente para serem isolados e triturados cinco pares de glândulas infectadas.

Outras vezes os pintos são sujeitos à picada, no mesmo local, de 10 mosquitos infectados. Estes últimos sugam até ficarem completamente cheios, e são examinados imediatamente depois de se alimentarem afim de ser indagada a capacidade infectante.

Depois das picadas ou da injeção de esporozoitos o local da inoculação é assinalado por um círculo de tinta negra "nankim".

Transcorrido determinado período de tempo é feita a excisão da pele do local inoculado, compreendendo o epiderme e o derme subjacente. O retalho assim obtido é esticado sobre um pedaço de papel de filtro, ao qual adere pela face epitelial. O derme é então raspado com uma pequena cureta. O produto da raspagem, constituído por elemento do tecido conjuntivo e células epiteliais das camadas profundas, é espalhado sobre lâminas, fixado pelo álcool metílico e corado pelo método de Giemsa. A observação dos preparados é feita com objetiva forte de imersão.

O material até agora examinado consta de biópsias feitas a partir de seis horas após a inoculação, até 48 horas depois do aparecimento da infecção sanguínea.

Nos preparados correspondentes às primeiras horas do período de incubação, teem sido encontrados elementos que suponho pertencerem à evolução dos esporozoitos. Entretanto não pude ainda observar estadios de transição entre os esporozoitos e os referidos elementos, por falta de material apropriado, isto é, retirado logo após a inoculação e daí por diante dentro das primeiras seis horas. Porisso não me ocuparei ainda nesta nota desses elementos, referindo-me apenas ligeiramente a êles, só o fazendo com detalhe quando observações posteriores esclarecerem sem nenhuma dúvida a sua verdadeira natureza. Por enquanto limitar-me-ei a assinalar o encontro de formas nitidamente definidas, apresentando todos os caracteres dos esquizontes do ciclo exoeritrocitário e localizadas no protoplasma de células do retículo-endotelio subcutâneo.

1. Preparados de seis e 12 horas. No primeiro foram vistos os elementos duvidosos acima referidos, em grande abundância, parecendo proporcional ao número elevado de esporozoitos injetados. São formações alongadas, com oito e mais grânulos de cromatina dispostos em fila como num rosário. No último preparado esses elementos eram sensivelmente menos abundantes.

2. De 18 horas. Foi visto apenas um preparado, no qual apareceu um elemento binucleado com os caracteres reproduzidos na fig. 1. Os dois grãos de cromatina eram bastante volumosos, apresentando textura nuclear muito nítida. O protoplasma era azul intenso, mais ou menos hialino. Os limites deste elemento eram bem demarcados por um estreito vacúolo.

3. De 24 horas. No único preparado examinado foi visto um elemento semelhante ao descrito no parágrafo anterior (fig. 2).

4. De 60 horas. A partir deste prazo os esquizontes exoeritrocitários mostraram-se mais frequentes. No presente preparado foram vistos vários deles, sem mais o vacúolo até então assinalado (fig. 3).

5. De 84 horas. Aquí eram muito frequentes as células parasitadas por oito e mais esquizontes. Não parecia tratar-se de elementos em divisão, conforme pode ser visto na fig. 4. A partir deste prazo apareceram constantemente no protoplasma dos esquizontes e também sobre o núcleo pequenas granulações violáceas semelhantes aos grãos de volutina. Posso afirmar com segurança que não se trata de hemozoina.

Em todos os casos que acabo de enumerar não foi encontrado qualquer vestígio de infecção sanguínea em numerosos exames de sangue periférico ou contido nos órgãos. Também não foram vistos parasitos exoeritrocitários nas vísceras. As observações foram feitas, portanto, rigorosamente dentro do período de incubação da malária.

Posteriormente, foram pesquisadas esquizogonias exoeritrocitárias no local da inoculação em três casos, respectivamente 1, 24 e 48 horas depois do aparecimento dos primeiros parasitos sanguíneos, isto é, logo após o fim do período de incubação. Estas esquizogonias apareceram com grande frequência em todos os casos, parecendo que o seu número diminuía à medida que progredia a infecção do sangue. Em muitas delas foram vistas as granulações violáceas já referidas. O aspecto da cromatina desses parasitos e a colorabilidade do seu protoplasma diferem de elemento para elemento, o que sem dúvida correspondente ao estadio evolutivo em que se encontra cada um destes. Essa diversidade de aspecto pode ser frequentemente observada nos parasitos de uma mesma célula hospedeira (fi. 5).

As observações testemunhas foram feitas em fragmentos de pele retirados de outras regiões dos próprios animais inoculados e de aves normais que não receberam qualquer tratamento. Só foram encontrados aspectos normais.

Todos esses achados servem de apôio à idéia de que as formas exoeritrocitárias constituem o elo de ligação entre os esporozoítos e os parasitos pigmentados dos glóbulos vermelhos. Quanto à sua permanência no organismo depois da eclosão da infecção sanguínea e ao seu aparecimento em casos infectados por inoculação de sangue, são assuntos cuja discussão escapa à natureza da presente nota.

Em trabalho mais completo, que será publicado oportunamente, relatarei as futuras observações a serem feitas em muito maior escala. Espero obter assim maior número de dados sobre as primeiras fases evolutivas do esporozoito no organismo do hospedeiro vertebrado e então compararei os meus resultados com os dos raros pesquisadores que se tem ocupado do assunto.

SUMMARY

The following is a summary of the studies made on the development of *Plasmodium gallinaceum* sporozoites inoculated into normal chicks.

Initially large numbers of laboratory reared *Aedes ægypti* were fed on pullets heavily infected with gametocytes. Following the infectious meal the mosquitoes were kept on a diet of sugar and water syrup until the appearance of the sporozoites in the salivary glands.

Normal chicks kept in hematophagous arthropod proof cages were then inoculated either by bite of the infected mosquitoes or by subcutaneous inoculations of salivary gland suspensions. By the first method ten mosquitoes fed to engorgement on each normal chick and were then sacrificed immediately afterwards to determine the sporozoite count. By the second method five pairs of salivary glands were dissected out at room temperature, triturated in physiological saline and inoculated subcutaneously.

The epidermis and dermis at the site of inoculation were excised from six hours after inoculation to forty eight hours after appearance of the parasites in the blood stream and stretched out on filter paper with the epithelial surface downward. The dermis was then curretted. Slides were made of the scrapings consisting of connective tissue and epithelial cells of the basal layers which were fixed by metyl alcohol and stained with Giemsa for examination under the oil immersion lens.

Skin fragments removed from normal chicks and from regions other than the site of inoculation in the infected chicks were used as controls. In these, only the normal histological aspect was ever encountered.

In the biopsy made at the earliest period following inoculation clearly defined elongated forms with eight or more chromatin granules arranged in rosary formation were found. The author believes these to be products of the sporozoite evolution. Search for transition stages between these forms and sporozoites is planned in biopsies to be taken immediately following inoculation and at given intervals up to the six hour period.

1.) 6 and 12 hour periods. The bodies referred to above found in the first period in great abundance, apparently in proportion to the large numbers of sporozoites inoculated, were perceptibly reduced in numbers in the second period.

2.) 18 hour period. Only one biopsy was examined. This presented a binuclear body shown in Fig. 1, having a more or less hyaline protoplasm staining an intense blue and a narrow vacuole delimiting the cell boundaries. The two chromatin grains were quite large presenting a clearly defined nuclear texture.

3.) 24 hour period. A similar body to that above (Fig. 2) was seen in the only preparation examined.

4.) 60 hour period. The exoerythrocytic schizonts were found more frequently from this period onward. Several such were found no longer to contain the previously described vacuoles (Fig. 3).

5.) 84 hour period. Cells bearing eight or more schizonts were frequently encountered here. That these are apparently not bodies in process of division may be seen in Fig. 4. From this time onward small violet granules similar to volutine grains appeared constantly in the schizont nucleus and protoplasm. These are definitely not hemozoin.

The above observations fell within the incubation period as repeated examinations of the peripheral and visceral blood were negative. Exoerythrocytic parasites also were never encountered in the viscera at this time.

Exoerythrocytic schizonts searched for at site of inoculation 1, 24 and 48 hours after the incubation period were present in large number at all three times with apparent tendency to diminish as the number within the blood stream increased. Many of them presented the violet granules mentioned above. The appearance of the chromatin and the intensity of staining of the protoplasm varied from body to body which doubtless corresponds to the evolutionary stage of each. This diversity of aspect may frequently be seen in the parasites of the same host cell (Fig. 5.).

These findings lend substance to the theory that the exoerythrocytic forms are the link between the sporozoites and the pigmented parasites of the

red blood corpuscles. The explanation of their continued presence in the organism after infection of the blood stream takes place and their presence in cases infected by the inoculation blood does not come within the scope of this work.

Large scale observations shortly to be undertaken will be reported in more detail particularly observations on the first evolutionary phases of the sporozoite within the organism of the vertebrate host.

REFERENCIAS

GRASSI, B.

1901. Die Malaria. Studien eines Zoologen. Jena.

JAMES, S. P.

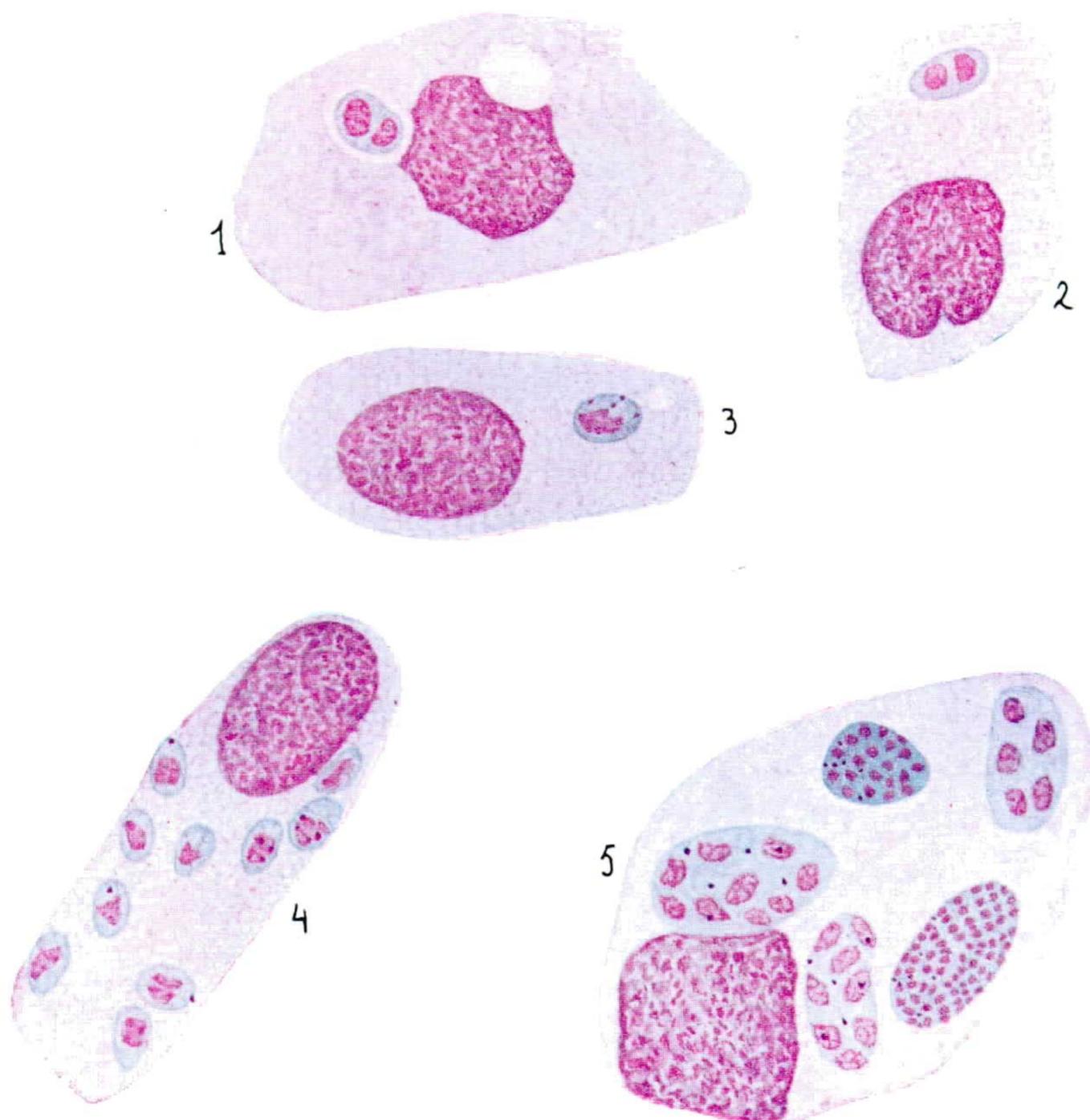
1931. Some general results of a study of induced malaria in England. Trans. Roy Soc. Trop. Med. Hyg. 24 (5) : 477-538.

PARAENSE, L., MEYER, H. & MENESES, V.

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

SCHAUDINN, F.

1903. Studien über krankheitserregende Protozoen. II. *Plasmodium vivax* (Grassi & Feletti) der Erreger des Tertianfiebers beim Menschen. Arb. Kaiserl. Gesundheitsmt. 19 : 169-250.



L. Paraense : Aspectos parasitários do P. Gallinaceum