

Observações preliminares sobre o ciclo exoeritrocitário do *Plasmodium juxtannucleare* Versiani e Gomes, 1941

por

W. Lobato Paraense

(Com 1 gráfico, 1 tabela e 1 estampa em cores)

O encontro de formas exoeritrocitárias do *P. juxtannucleare* VERSIANI & GOMES, 1941, foi assinalado até agora por um único autor (BARRETO 1943). Esta constatação foi feita na amostra original, isolada pelos autores da descrição da referida espécie (amostra 14-A). As observações de BARRETO foram baseadas no exame de cérebro, baço, fígado, pulmão e medula óssea de 5 frangos inoculados com sangue parasitado. As aves contavam cêrca de dois meses de idade ao serem inoculadas, e foram sacrificadas entre 34 e 52 dias após a inoculação. O exame das vísceras revelou a presença, em duas aves, de formas exoeritrocitárias localizadas exclusivamente nas células endoteliais dos capilares do cérebro, não tendo sido encontradas formas análogas nos órgãos restantes. As aves positivas tinham sido sacrificadas respectivamente no 34º e no 52º dias seguintes à inoculação. Os parasitos eram muito raros em ambos os casos, variando entre 2 e 19 o número de blocos de cromatina existentes nos esquizontes encontrados.

Durante dois anos mantive em meu laboratório a amostra 14-A, a partir de uma ave que me foi cedida por VERSIANI. Nesse período examinei 23 aves de idade variável, inoculadas com essa amostra pelas vias intramuscular ou intravenosa. O exame dos órgãos desses animais, ora sacrificados ora mortos em consequência da infecção, nunca revelou a presença de formas exoeritrocitárias. Estes resultados negativos foram por mim comunicados a VERSIANI, que os referiu em nota adicional (VERSIANI E GOMES, 1943) sobre o *P. juxtannucleare*. Na referida nota dizem estes autores que também não encontraram eles próprios formas exoeritrocitárias no material com que trabalharam.

O *P. juxtannucleare* foi assinado com certa facilidade por BELTRÁN (1941, 1943-a) em galinhas de Chiapas, no México. Também este autor não evidenciou formas exoeritrocitárias no seu material (1943-a, 1943-b).

CASSAMAGNAGHI (1947), que encontrou o *P. juxtannucleare* no Uruguai, não se refere em seu trabalho a formas exoeritrocitárias deste plasmódio.

Em maio de 1943 tive oportunidade de isolar uma amostra do *P. juxtannucleare*, a partir de uma galinha adulta adquirida, juntamente com outras cinco normais, no Mercado Municipal da cidade de Belo Horizonte, Estado de Minas Gerais. As seis aves provinham da localidade JAPÃO DE OLIVEIRA, situada na região oeste do referido Estado. Esta amostra vem sendo mantida no laboratório, através de subinoculações de sangue parasitado.

Em vista de me achar ocupado com outros trabalhos, não submeti esta amostra desde logo a um estudo sistemático, limitando-me a conservar em arquivo o material obtido dos animais inoculados até o princípio de 1947. Nos últimos meses iniciei o exame deste material, obtendo resultados que, acrescidos de dados resultantes de experiências ulteriores, são relatados na presente nota. Neste trabalho não me ocuparei detalhadamente das diversas questões sugeridas pelo estudo desse material. Estas serão apresentadas em notas subsequentes.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 178 pintos Light Sussex, Rhode Island vermelhos e Leghorn brancos, de peso variável entre 40 e 60 g no momento da inoculação.

Os animais foram inoculados com sangue parasitado, sempre pela via intravenosa. Quando foi necessário avaliar o número de parasitos injetados, foram feitas contagens do número de hemácias por mm³ de sangue e do número de parasitos em 1000 hemácias, no sangue da ave doadora convenientemente oxalatado. Com estes dados foi calculado o número de parasitos existentes em 1 mm³ de sangue. Por fim foi avaliado o volume necessário para perfazer o número de parasitos que se desejava inocular em cada animal. Se a quantidade de sangue a ser inoculada em cada ave era muito pequena, fazia-se a conveniente diluição com solução fisiológica.

Um grupo de animais foi submetido a tratamento pelo cloridrato de quinina, ministrado em uma única dose diária, correspondente a 150 mg por Kg de peso do corpo. O medicamento foi aplicado em solução aquosa, diretamente no esôfago, através de sonda apropriada.

As contagens dos parasitos eritrocitários foram feitas em preparados de sangue estirado, corados pelo método de Leishman e examinados com objetiva forte de imersão. O número de hemácias parasitadas, expresso em forma percentual, baseia-se na contagem de 1000 glóbulos.

Os parasitos exoeritrocitários foram procurados em estiraços de cérebro, pulmão, fígado, baço e medula óssea previamente fixados pelo álcool metílico e corados pelo Giemsa. Nos preparados de cérebro foi assinalado o número de formas exoeritrocitárias encontradas em 100 capilares. Nos outros órgãos a pesquisa foi feita em 100 campos microscópicos (binocular Zeiss, prisma 1.5, objetiva 100, ocular 5); para isto foi escolhida uma faixa do preparado em que os elementos histológicos estivessem bem distribuídos, não formando camadas superpostas.

RESULTADOS

MORFOLOGIA

Dispensar-me de fazer, na presente nota, uma descrição morfológica dos estádios exoeritrocitários do *P. juxtannucleare*. Eles são semelhantes aos das espécies *gallinaceum*, *cathemerium*, *praecox*, etc., achando-se figurados na estampa que ilustra este trabalho.

PERÍODO PRÉ-PATENTE DA INFECÇÃO EXOERITROCITÁRIA

Nos plasmódios que desenvolvem o ciclo exoeritrocitário depois da inoculação de sangue parasitado, a infecção em tais condições aparece inicialmente apenas nas hemácias. Só depois de transcorrido um prazo de vários dias podem ser vistas formas exoeritrocitárias. Este prazo deve ser entendido como o período pré-patente da infecção exoeritrocitária.

Para determinar a duração do período pré-patente referido foram inoculados simultaneamente três lotes de aves, cada lote compreendendo 10 animais. O sangue infectante proveiu de uma única ave. As doses de parasitos inoculadas em cada animal variaram de um lote a outro, a saber: lote 1 — 80.000.000; lote 2 — 5.000.000; lote 3 — 500.000 parasitos. Depois estas aves foram sendo sacrificadas, para pesquisa de formas exoeritrocitárias, com os seguintes resultados:

Lote 1 — Deste lote foi sacrificada uma ave diariamente, a partir do 5.º dia. Até o 8.º dia estavam todas negativas. No 9.º dia foi morta a ave n. 5, que mostrou raras formas exoeritrocitárias no baço e na medula óssea. Imediatamente após a constatação deste resultado foram mortas as cinco aves restantes, das quais estavam duas negativas e três positivas, estas últimas apresentando raros parasitos.

Lote 2 — Do 5.º ao 8.º dia foi sacrificada uma ave diariamente. Mais duas foram mortas, no 10.º e no 12.º dias, respectivamente. Todas elas, em

numero de seis, achavam-se negativas. No 14.º dia foi morta a ave n.º 7, que mostrou numerosas formas exoeritrocitárias no baço (21%). O número relativamente alto de formas encontradas neste animal sugere que a infecção já poderia ter sido evidenciada pelo menos desde o dia anterior. Imediatamente depois foram sacrificadas as três aves restantes, achando-se todas positivas, com raros parasitos.

Lote 3 — Do 5.º ao 8.º dia foi sacrificada uma ave diariamente. Daí em diante, a contar do 10.º dia, foi morta uma ave em cada dois dias. Sómente no 18.º dia foi vista pela primeira vez a infecção exoeritrocitária neste lote, encontrando-se raros parasitos no baço da ave examinada. A última que restava foi também sacrificada e apresentou raros parasitos no baço e na medula óssea.

Na experiência que acaba de ser descrita, a duração mínima do período pré-patente da infecção exoeritrocitária foi de nove dias. A observação superficial dos fatos assinalados leva a crêr na existência de uma relação inversa entre a duração do período pré-patente e a quantidade de parasitos inoculados. Esta questão, entretanto, será examinada em outro trabalho. Pesquisas já bem adiantadas têm revelado que o assunto apresenta maior complexidade, parecendo que a dose de parasitos inoculados tem influência apenas secundária.

INCIDÊNCIA RELATIVA DOS PARASITOS EXOERITROCITÁRIOS NOS ÓRGÃOS EXAMINADOS

Como ficou dito acima, as formas exoeritrocitárias foram pesquisadas nos seguintes órgãos: cérebro, pulmão, fígado, baço e medula óssea. Destes, foi o baço que apresentou em cada caso o maior número de parasitos. Esta constatação acha-se em desacordo com os resultados de BARRETO (1943), que só encontrou formas exoeritrocitárias nos endotélios dos capilares cerebrais, apesar de as haver procurado nos mesmos órgãos acima enumerados.

A infecção do baço pode ser muito intensa, a ponto de serem encontrados em alguns casos mais de cinco parasitos por campo microscópico. Seguem-se ao baço, em ordem decrescente de intensidade, a medula óssea, o fígado, o pulmão e o cérebro.

Na mesma sequência observa-se o aparecimento dos parasitos. O primeiro órgão a se mostrar infectado é o baço, que algumas vezes é acompanhado pela medula óssea. Em muitos casos, entretanto, esta última apresenta formas exoeritrocitárias no dia imediato. O fígado e o pulmão acompanham-na ou seguem-na um dia depois.

A constatação dos parasitos no cérebro é significativamente mais tardia, e aqui eles tendem a desaparecer mais rapidamente que nos outros órgãos. No

material de que disponho até agora tenho observado que a infecção cerebral só é evidenciável dentro de um período limitado a cerca de 10 dias. Assim, estando o cérebro positivo, todos os demais órgãos referidos também estão. É possível que, depois de ultrapassado aquele período, um exame bastante prolongado permita o encontro no cérebro de raríssimas formas. Refiro-me, entretanto, neste trabalho, à pesquisa de parasitos em 100 capilares apenas.

A infecção dos endotélios cerebrais nunca é tão intensa quanto a produzida pelo *P. gallinaceum*. Enquanto nesta última espécie podem ser vistos mais de 90% dos capilares parasitados, no *P. juxtannucleare* o número máximo observado no meu material é de 15%.

No gráfico 1 pode ser apreciada a incidência relativa da infecção exoeritrocitária nos cinco órgãos examinados. Aí também se observa a tendência

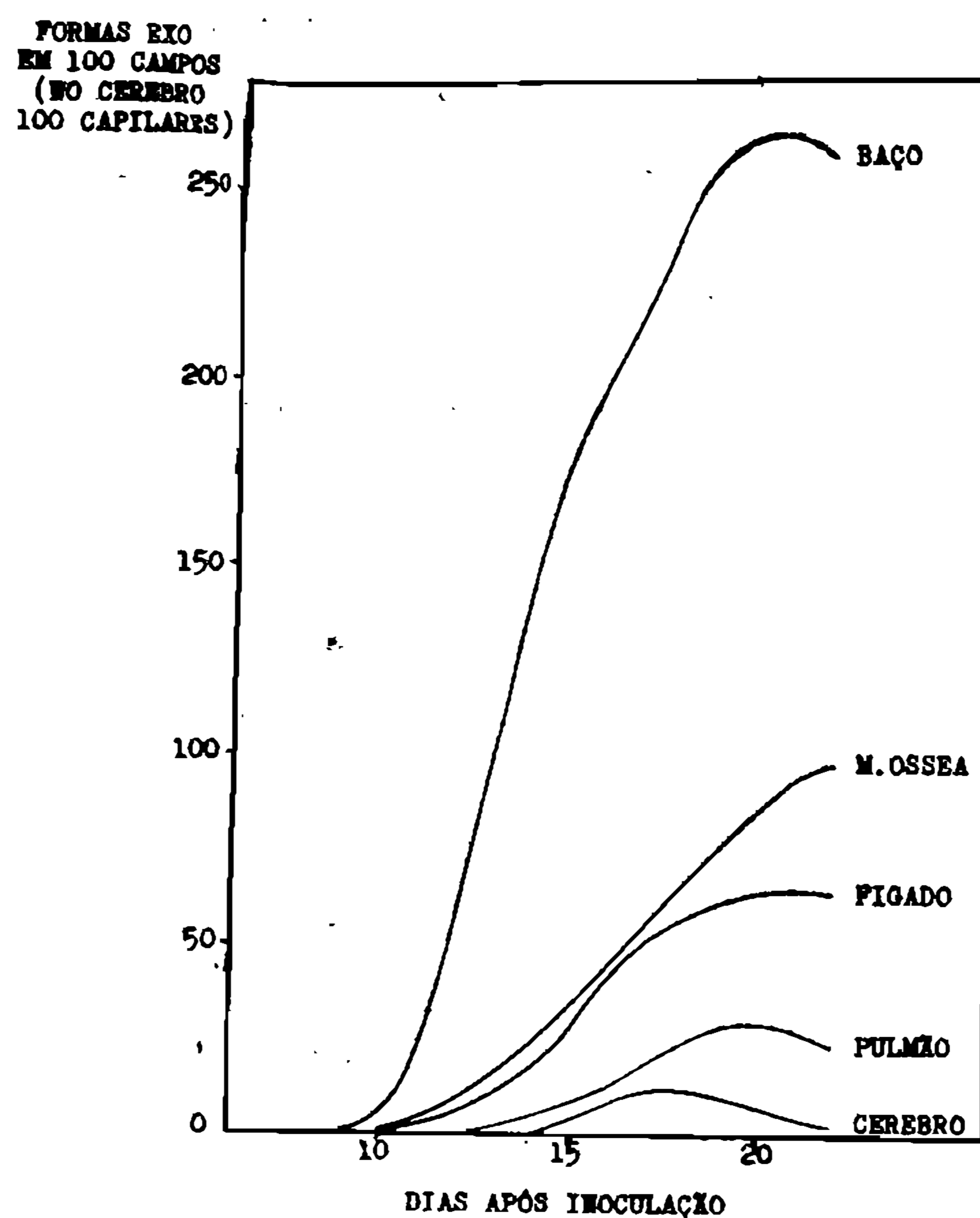


Gráfico 1. Tendência da infecção exoeritrocitária em 40 pintos inoculados com *P. juxtannucleare* (5.000.000 parasitos, via intravenosa) e mortos entre o 8.º e o 22.º dias da infecção

da infecção em cada órgão. Este gráfico é baseado no exame de 40 aves, inoculadas com 5.000.000 de parasitos eritrocitários cada uma, que foram sacrificadas ou morreram em consequência da infecção entre o 8.º e o 22.º dias após a inoculação. Tendo em vista a variação, às vezes bem acentuada, entre os dados fornecidos por um pequeno grupo de aves examinadas no mesmo dia, e o número relativamente pequeno de animais usados nesta observação particular, não se pode considerar o referido gráfico altamente representativo

quanto à tendência da infecção exoeritrocitária. Entretanto os dados obtidos parecem indicar que, reproduzidas as condições desta observação, a intensidade máxima da infecção é atingida em torno do 20.º dia e daí em diante o parasitismo tende a declinar. O material disponível não permitiu prolongar a observação por mais tempo, a fim de acompanhar este declínio.

Quanto à incidência relativa da infecção exoeritrocitária nos diferentes órgãos, o gráfico 1 satisfaz plenamente.

A infecção dos endotélis dos capilares cerebrais apresenta características diversas daquela produzida pelo *P. gallinaceum*. Nesta última espécie os parasitos são encontrados de preferência nos referidos endotélis, ao passo que no *P. juxtannucleare* observa-se notável predileção para as células retículo-endoteliais do baço. Devido à pequena intensidade da concentração parasitária no cérebro, as formas endoteliais do *P. juxtannucleare* aparecem isoladas, ao passo que as do *P. gallinaceum*, muito numerosas, confundem-se com as vizinhas, dando a impressão de enormes esquizogonias.

AÇÃO PATOGÊNICA

Em três notas precedentes (1946, 1947-a, 1947-b) tive oportunidade de demonstrar a ação patogênica das formas exoeritrocitárias do *P. gallinaceum*. As aves jovens tratadas com quinina não apresentam infecção eritrocitária significativa e no entanto morrem cerca de duas semanas após a inoculação em consequência da oclusão dos capilares do sistema nervoso central pelos parasitos exoeritrocitários que bloqueiam a maioria absoluta das células endoteliais. Este resultado pode ser obtido utilizando qualquer medicamento ativo contra as formas eritrocitárias mais inativos contra as exoeritrocitárias (quinina, atebrina, cloroquina).

Esta experiência foi repetida com o *P. juxtannucleare*, em 15 aves inoculadas com a dose individual de 15.000.000 de parasitos eritrocitários. No 5.º dia após a inoculação o número de hemácias parasitadas achava-se entre 2 e 4%, sendo então iniciada a terapêutica pela quinina.

Na tabela 1 são encontrados os dados referentes a esta experiência. Excepcionalmente as aves ns. 1 e 15, que foram sacrificadas, todas as restantes morreram em consequência da infecção exoeritrocitária, pois a parasitemia não ultrapassou 4% e foi logo deprimida pelo medicamento.

Pode-se afirmar, portanto, que no *P. juxtannucleare* a infecção exoeritrocitária é capaz de provocar alterações que conduzem à morte as aves inoculadas em idade muito baixa.

TABELA 1

RESULTADO DA CONTAGEM DE FORMAS EXOERITROCITÁRIAS DO P. JUXTANUCLEARE NO BAÇO, MEDULA ÓSSEA, FÍGADO, PULMÃO E CÉREBRO DE 15 PINTOS INOCULADOS POR VIA INTRAVENOSA COM 15.000.000 DE PARASITOS PARA CADA AVE E TRATADOS COM CLORIDRATO DE QUININA (0.15/Kg) A PARTIR DO 5º. DIA DA INFECÇÃO

AVE Nº.	DIA DA INFECÇÃO	FORMAS EXOERITROCITÁRIAS EM				
		100 CAMPOS				100 CAPILARES
		Baço	M. óssea	Fígado	Pulmão	Cérebro
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
1*.....	11	5	0	0	0	0
2.....	12	165	14	4	1	0
3.....	13	1206	132	104	9	4
4.....	14	847	103	75	10	1
5.....	15	583	91	70	8	0
6.....	15	407	249	101	15	4
7.....	15	516	138	97	12	2
8.....	16	453	210	82	9	2
9.....	16	380	317	49	5	1
10.....	17	628	435	117	18	7
11.....	18	310	209	76	16	15
12.....	19	286	105	54	9	3
13.....	20	230	113	68	15	3
14.....	24	56	23	0	5	0
15*.....	65	0	0	0	0	0

(*) Sacrificada. As restantes morreram em consequência da infecção exoeritrocitária.

Os números entre parênteses, no alto das colunas, destinam-se às referências no sumário em inglês.

FUTURAS VERIFICAÇÕES EM OUTRAS AMOSTRAS

As formas exoeritrocitárias são encontradas com grande facilidade nas aves inoculadas com a presente amostra de *P. juxtannucleare*. Tal comportamento leva a supor que a referida amostra difere neste particular das outras até aqui isoladas. Recentemente foi-me possível localizar um foco de malária *juxtannucleare* na região Oeste do Estado de Minas Gerais, em Arraial Novo, zona rural do município de Bambuí. Em Bambuí acha-se funcionando há vários anos, sob a direção do Dr. Emmanuel Dias, o Centro de Estudos e Profilaxia da Moléstia de Chagas deste Instituto. Por solicitação minha o auxiliar Lucílio Martins, do Serviço do Dr. Dias, colheu amostras de sangue de galinhas, sendo 12 na própria cidade de Bambuí e 16 em Arraial Novo. Destas últimas, seis estavam infectadas pelo *P. juxtannucleare*, tendo sido possível adquirir quatro, que se acham neste laboratório. Brevemente iniciarei o estudo destas quatro amostras e os resultados obtidos serão publicados nestas *Memórias*.

PRELIMINARY OBSERVATIONS ON THE EXOERYTHROCYTIC SCHIZOGONY OF PLASMODIUM JUXTANUCLEARE VERSIANI AND GOMES, 1941

This paper is based on the study of 178 chicks which were infected with *P. juxtannucleare* by intravenous inoculation of parasitized blood when weighing 40 to 60 g.

MORPHOLOGY

Plate 1 shows the morphological aspect of the parasites as they were found in bone marrow (1, 2), spleen (3, 4, 5, 10, 11), liver (6, 8, 9), lungs (7) and brain (12-15).

PRE-PATENT PERIOD OF THE EXOERYTHROCYTIC INFECTION

The length of this period was determined in three batches of 10 birds each which were respectively inoculated with 80 (batch 1), 5 (batch 2) and 0.5 (batch 3) million parasites.

Batch 1 — From the 5th day onward one bird was killed each day to search for exoerythrocytic forms. The first positive bird, showing scattered parasites in spleen and bone marrow, was found on the 9th day after inoculation. Immediately after this finding the five remaining birds were killed. Two of them were negative and three positive, the latter showing rare exoerythrocytic parasites.

Batch 2 — One bird daily was killed on the 5th to 8th, 10th and 12th days. All were negative. The next bird was killed on the 14th day and showed numerous exoerythrocytic forms in the spleen (21 per 100 fields). This relatively high number suggests that the infection could have been detected at least on the previous day. Immediately after this finding the three remaining chicks were killed and a few parasites were found in all of them.

Batch 3 — One chick was killed on each of the following days: 5th to 8th, 10th, 12th, 14th and 16th days, with negative results. The one which was killed on the 18th day revealed a slight exoerythrocytic infection in the spleen. The only remaining chick was killed immediately after and showed rare parasites in spleen and bone marrow.

A superficial consideration of these results leads one to believe that there is an inverse relation between the lengthening of the pre-patent period of the exoerythrocytic infection and the quantity of erythrocytic parasites inoculated. This subject will be examined in a further paper, but it seems that the influence of the dose of parasites is rather secondary.

RELATIVE INCIDENCE OF THE EXOERYTHROCYTIC PARASITES IN THE ORGANS EXAMINED

The spleen is the organ in which the largest number of exoerythrocytic parasites was found in every case. The splenic infection may be so heavy as to be seen more than five parasites per field. The following organs showed exoerythrocytic forms in decreasing sequence: bone marrow, liver, lungs and brain.

The beginning of the exoerythrocytic infection in the brain is significantly retarded and here the infection is limited to approximately ten days because the exoerythrocytic forms tend to disappear from this organ more quickly than from the others. It is possible that a very accurate examination would reveal some rare forms after that period.

Graph 1 shows the relative incidence of the exoerythrocytic infection in the five organs referred to above and the trend of the infection in each one. This graph is based on the examination of 40 birds inoculated with 5 million parasites and killed or dying between the 8th and 22nd days after inoculation: X = days after inoculation; Y = exoerythrocytic forms per 100 fields in spleen (*baço*), bone marrow (*m. ossea*), liver (*figado*), lung (*pulmão*), or per 100 capillaries in brain (*cerebro*). The available material was not enough to allow extending this observation beyond the 22nd day. The infection of the endothelial cells of the brain capillaries is never so heavy as that produced by *P.*

gallinaceum. In *P. juxtannucleare* infections 15 exoerythrocytic forms was the highest number seen per 100 capillaries.

PATHOGENIC ACTION

In three previous papers (Paraense, 1946, 1947-a, 1947-b) the pathogenic action of the exoerythrocytic forms of *P. gallinaceum* was studied. When young chicks are given quinine from the day of inoculation significant erythrocytic infection does not develop, but they die in spite of continuous treatment on the second week after inoculation. Death is chiefly caused by the uncontrolled development of the exoerythrocytic parasites in the endothelial cells of the capillaries of the central nervous system bringing about the occlusion of the capillaries.

This experiment was repeated with *P. juxtannucleare*. Fifteen birds were inoculated each with 15 million parasites. On the 5th day of infection the parasitized red cell counts ranged between 2 and 4 per cent. Quinine treatment was then started (150 mg per kilo).

In table 1 the results of this experience are presented. The headings of the columns are to be understood as follows: (1) birds no.; (2) day of infection; exoerythrocytic forms per 100 fields in (3) spleen, (4) bone marrow, (5) liver, (6) lung; exoerythrocytic forms per 100 capillaries in (7) brain.

All of the birds but nos. 1 and 15, which were killed, died on account of the exoerythrocytic infection, since the parasitemia did not exceed 4 per cent and was soon depressed by quinine.

FURTHER VERIFICATIONS ON OTHER STRAINS

Exoerythrocytic forms are very easily found in the present strain of *P. juxtannucleare*. Its behavior relative to exoerythrocytic schizogony suggests that this strain is different from the others thus far observed. Recently the author discovered a focus of *juxtannucleare* malaria in Arraial Novo, rural zone of Bambuí, Western State of Minas Gerais, where six of 16 chickens examined for *P. juxtannucleare* were positive. Four of these birds were purchased by this laboratory and investigations are to be started on these strains.

REFERÊNCIAS

BARRETO, M. P.

1943. Malária aviária. III. Sobre o encontro de formas exoeritrocíticas do "*Plasmodium juxtannucleare*" Versiani e Gomes, 1941. Nota prévia. *Hospital* 24 (5): 643-645.

BELTRÁN, E.

1941. Hallazgo de *Plasmodium juxtannucleare* Versiani y Furtado en gallinas de Chiapas. *Rev. Inst. Salub. Enj. Trop.* 2 (3-4) : 353-354.

BELTRÁN, E.

- 1943-a Características de la cepa mexicana (14-B) de *Plasmodium juxtannucleare* Versiani y Furtado, 1941. *Ibid.* 4 (3) : 265-272.

BELTRÁN, E.

- 1943-b Adelantos recientes en el conocimiento de los plasmodios de la gallina doméstica (*Gallus gallus*). *Ibid.* 4 (4) : 327-335.

CASSAMAGNAGHI, A.

1947. Malaria en las aves del Uruguay. *Bol. Mens. Dir. Ganad.* 29 (2) : 105-129.

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.

PARAENSE, W. L.

- 1947-a Estudos sobre o ciclo exoeritrocitário do *Plasmodium gallinaceum*. *Ibid.* 45 (1) : 101-118.

PARAENSE, W. L.

- 1947-b Ação patogênica das formas exoeritrocitárias do *Plasmodium gallinaceum*. 3. Algumas características das hemácias nas infecções tratadas com quinina *Ibid.* 45 (2) : 345-359.

VERSIANI, W. & B. F. GOMES

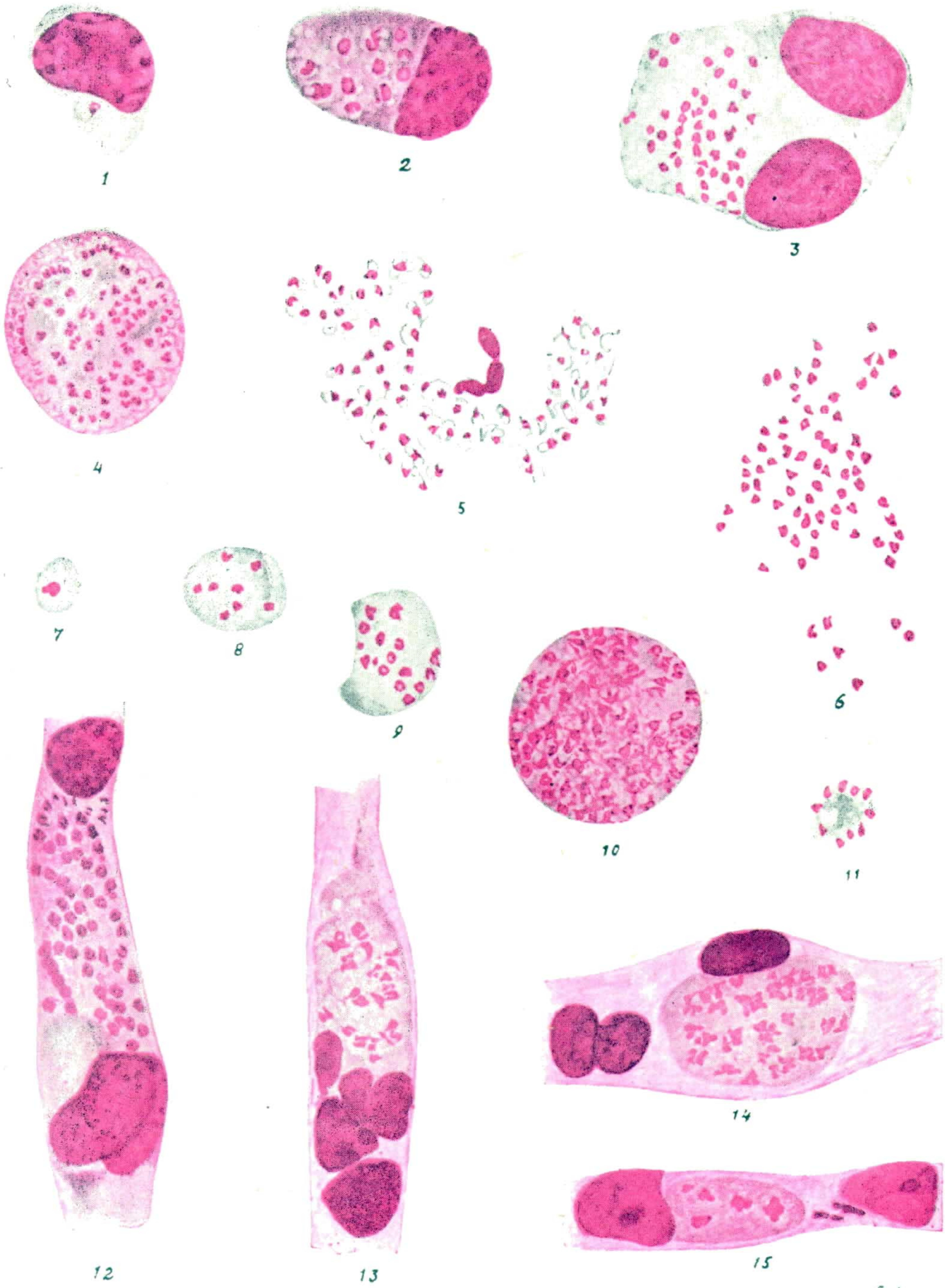
1943. "*Plasmodium juxtannucleare*", parasita da galinha doméstica. (Notas adicionais). *Rev. Bras. Biol.* 3 (1) : 113-117.

ESTAMPA 1

Formas exoeritrocitárias do *P. juxtannucleare* nos órgãos de pintos inoculados com sangue parasitado

- 1, trofozoíto parasitando macrófago da medula óssea.
- 2, esquizogonia em macrófago da medula óssea.
- 3, esquizogonia em macrófago do baço.
- 4, fase terminal da esquizogonia em macrófago do baço cujo núcleo foi expulso pelo parasito, restando apenas o citoplasma alterado da célula hospedeira.
- 5, merozoítos libertados após rotura da célula hospedeira, cujos restos nucleares aparecem no centro (baço).
- 6, merozoítos libertados após rotura da célula hospedeira (fígado).
- 7-11, formas evolutivas originalmente intracelulares, que aparecem livres devido à rotura mecânica das células continentas durante a manipulação do preparado.
- 7, trofozoíto (pulmão).
- 8-9, esquizogonias em fases intermediárias (fígado).
- 10, esquizogonia adiantada (baço).
- 11, pequena rosácea (baço).
- 12-15, diversos estádios esquizogônicos nas células endoteliais dos capilares do cérebro.

Desenhos de A. Leal. Câmara clara, microscópio Zeiss, oc. 10, obj. HI 100.



A. L. L.
3.11