

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
COMPORTAMENTO E BIOLOGIA ANIMAL

**ASPECTOS BIOLÓGICOS DA INOCULAÇÃO EXPERIMENTAL E ATIVIDADE
MALARICIDA DA 4-(6-MERCAPTOPURINA)-7-CLOROQUINOLINA EM *Gallus
gallus* LINNAEUS, 1758 EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS POR *Plasmodium
(Novyella) juxtannucleare* VERSIANI & GOMES, 1941 (APICOMPLEXA,
PLASMODIIDAE)**

USHA VASHIST

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências
Biológicas, da Universidade Federal de Juiz de
Fora – PPGCB, como parte dos requisitos para a
obtenção do título de Mestre em Ciências
Biológicas (Área de concentração em
Comportamento e Biologia Animal)

Juiz de Fora, Minas Gerais
Fevereiro de 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
COMPORTAMENTO E BIOLOGIA ANIMAL

**ASPECTOS BIOLÓGICOS DA INOCULAÇÃO EXPERIMENTAL E ATIVIDADE
MALARICIDA DA 4-(6-MERCAPTOPURINA)-7-CLOROQUINOLINA EM *Gallus
gallus* LINNAEUS, 1758 EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS POR *Plasmodium
(Novyella) juxtannucleare* VERSIANI & GOMES, 1941 (APICOMPLEXA,
PLASMODIIDAE)**

USHA VASHIST

Orientadora: **Profa. Dra. MARTA D'AGOSTO**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Juiz de Fora – PPGCB, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de concentração em Comportamento e Biologia Animal)

Juiz de Fora, Minas Gerais
Fevereiro de 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
COMPORTAMENTO E BIOLOGIA ANIMAL

**ASPECTOS BIOLÓGICOS DA INOCULAÇÃO EXPERIMENTAL E ATIVIDADE
MALARICIDA DA 4-(6-MERCAPTOPURINA)-7-CLOROQUINOLINA EM *Gallus
gallus* LINNAEUS, 1758 EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS POR *Plasmodium
(Novyella) juxtannucleare* VERSIANI & GOMES, 1941 (APICOMPLEXA,
PLASMODIIDAE)**

USHA VASHIST

Orientadora: **Profa. Dra. MARTA D'AGOSTO**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Juiz de Fora – PPGCB, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de concentração em Comportamento e Biologia Animal)

Juiz de Fora, Minas Gerais
Fevereiro de 2007

“Ó profundidade das riquezas e da sabedoria, e do conhecimento de Deus! Quão inescrutáveis são os teus julgamentos e além de pesquisa são os teus caminhos!”

“Porque todas as coisas são Dele, e por Ele, e para Ele. Glória a Ele para sempre. Amém.”

(Tradução do Novo Mundo das Escrituras Sagradas, Romanos 11:33,36)

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho foi possível graças aos esforços de muitas pessoas que colaboraram com o meu caminhar, várias contribuições que recebi, do conselho pessoal à ajuda prática profissional, tudo isso torna valiosa esta experiência e me faz continuar acreditando que apesar de experiências amargas nada é mais sublime do que o convívio com seres humanos. Portanto começo a expressar meus sinceros agradecimentos à Jeová Deus que me dá vida e a quem peço sempre discernimento e sabedoria para prosseguir ajudando e sendo ajudada. Estar vivo é a maior dádiva.

Tão preciosa e admirável em minha vida é minha orientadora profa. Dra. Marta D'Agosto a quem agradeço a atenção, oportunidade de realizar objetivos tão almeçados, aos ensinamentos, ao seu carinho e paciência, à sua ajuda prática no laboratório e aos sábios conselhos, a sua confiança em mim depositada e, sobretudo à sua postura ética e profissional que me faz ter orgulho de ser sua orientada.

Agradeço ao ilustre prof. Dr. Érik Daemon que sempre tão gentil e alegre deu sugestões tão fundamentais para o sucesso deste trabalho.

Agradeço imensamente a Profa. Dra. Juliane Floriano Lopes, com a qual pude contar para a realização da análise estatística deste trabalho, sua boa vontade e sobretudo capacidade foram essenciais para a interpretação dos resultados.

Agradeço ao coordenador do curso prof. Dr. Fábio Prezoto que sempre foi solícito e extremamente gentil em dar conselhos e ajuda profissional.

Aos Profs. Rafael Gióia Martins e Elisabete Cristina de Almeida Bessa agradeço a forma sempre agradável de lidarem comigo e às palavras e ações de incentivo.

Ao prof. Dr. Adilson David da Silva agradeço a oportunidade de trabalhar nesta área da química que tanto gosto e admiro, na busca por novas soluções a problemas tão antigos,

agradeço ainda a toda atenção dispensada, aos ensinamentos, a confiança e ao convívio que foi pouco mas sempre de grande qualidade.

A funcionária Marlu quero expressar profundos agradecimentos por sua eterna boa vontade e disposição em ajudar, informar e sobretudo consolidar o que foi necessário, também agradeço sua simpatia, bom-humor e forma respeitosa de lidar conosco.

A funcionária Rosângela agradeço toda a ajuda prestada e preocupação com nosso bem-estar.

A mestranda Patrícia Silveira agradeço à sua ajuda profissional, aos seus conselhos práticos e a sua determinação.

Às graduandas Bianca e Noemi agradeço a toda ajuda prestada que foi sempre com boa vontade e esmero.

Aos colegas da turma de mestrado agradeço à todos sem exceção pelo convívio que muito me acrescentou na vida pessoal e profissional, mas faço aqui um especial agradecimento aos meus queridos irmãosinhos por parte de orientadora e turma, Isabel Martinelle, Roberto Dias Júnio e Moara Lemos, sinto profundo carinho e admiração profissional e pessoal por cada um destes.

Agradeço à Dona Eny , que nos forneceu as aves doadoras para este experimento.

Às granjas Planalto, Uberlândia, MG, agradeço ao Sr. Marco Antônio pela doação das aves de excelente linhagem para a realização deste experimento.

À minha amada família tenho muito a agradecer. À minha querida mãe Nancy agradeço toda a dedicação e esforços que sempre fez em me ajudar a alcançar meus objetivos, sei que seu amor por mim é real e suas motivações são as melhores possíveis, sou admiradora de muitas de suas qualidades e agradeço pela forma como me educou, os valores que me passou e principalmente ao exemplo de fé e dedicação. Ao meu querido pai Sanjay agradeço pelo seu carinho, amizade, confiança e respeito aos meus ideais, agradeço ainda pelo seu companheirismo e amor que foi tão fortalecedor na reta final. Aos meus irmãos Daniel e Amitabh agradeço pelo amor que tenho certeza que sentem por mim e também por ficarem felizes a cada conquista de nossa família.

Ao meu amado André Ramos agradeço infinitamente, pelo seu companheirismo, lealdade, incentivo, ajuda prática, boa-vontade, paciência e sobretudo ao seu imenso amor (que é recíproco e real), sua presença em minha vida foi fundamental para que todo este trabalho acontecesse de forma feliz e recompensadora. Sua presença junto a mim no universo da pesquisa fortaleceu nossa união e me fez admirá-lo ainda mais pela sua generosidade e determinação em ajudar à pessoa amada. Muito obrigada meu amor!

Agradeço ao PPGCB (Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas – Área de concentração em Comportamento e Biologia animal) pela bolsa concedida durante o mestrado.

Enfim a todos que colaboraram meu muito OBRIGADA!

SUMÁRIO

LISTA DE QUADROS.....	X
LISTA DE FIGURAS.....	xi
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xvi
INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	1
1.1 Malária em aves e <i>Plasmodium juxtannucleare</i>	1
1.2 Drogas anti-maláricas e modelos experimentais.....	6
2. CAPÍTULO I - BUSCA POR AVES NATURALMENTE INFECTADAS POR <i>Plasmodium (Novyella) juxtannucleare</i> (HAEMOSPORIDA, PLASMODIIDAE) :	
IMUNOSSUPRESSÃO E PARASITEMIA.....	8
2.1 INTRODUÇÃO.....	9
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	10
2.2.1. Busca por aves naturalmente infectadas por <i>Plasmodium juxtannucleare</i>	10
2.2.2. Escolha das aves para imunossupressão.....	11
2.2.3. Correlação da Parasitemia das aves imunossuprimidas com Temperatura, Peso e Microhematócrito.....	11
2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	12
2.3.1. Prevalência e Parasitemia de <i>P. juxtannucleare</i> nas aves das granjas visitadas.....	12
2.3.2. Parasitemia e valores médios de estádios eritrocíticos de <i>P. juxtannucleare</i> nas aves submetidas à imunossupressão.....	12
2.3.3. Peso das aves e Sinais clínicos.....	15
2.3.4. Temperatura corporal.....	16
2.3.5. Hematócrito.....	17
2.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	18
3. CAPÍTULO II: INFECCÃO EXPERIMENTAL DE <i>Plasmodium (Novyella)</i> <i>juxtannucleare</i> VERSIANI & GOMES, 1941 (HAEMOSPORIDA, PLASMODIIDAE)	

EM <i>Gallus gallus</i> L., 1758 (AVES, GALLIFORMES): AVALIAÇÃO DAS VIAS DE INOCULAÇÃO INTRAMUSCULAR E INTRAPERITONIAL.....	21
3.1. INTRODUÇÃO.....	22
3.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.3. RESULTADOS.....	25
3.3.1. Infecção experimental.....	25
3.3.2. Análise comparativa entre as doses inoculadas via intraperitonal.....	25
3.3.3. Análise comparativa entre as doses inoculadas via intramuscular.....	25
3.3.4. Análise comparativa entre as vias de inoculação intramuscular e intraperitonal com 0,3mL de sangue infectado.....	26
3.3.5. Análise Comparativa entre as vias de inoculação intramuscular e intraperitonal com 0,5mL de sangue infectado.....	27
3.3.6. Período de Pré-Patência, Pico de Parasitemia e Número Médio de parasitos.....	28
3.3.7. Sinais Clínicos	29
3.4. DISCUSSÃO.....	30
3.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32
4. CAPÍTULO III: ATIVIDADE MALARICIDA DA 4-(6-MERCAPTOPURINA)-7-CLOROQUINOLINA EM <i>Gallus gallus</i> LINNAEUS, 1758 EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS POR <i>Plasmodium (Novyella) juxtannucleare</i> VERSIANI & GOMES, 1941 (APICOMPLEXA, PLASMODIIDAE).....	35
4.1 INTRODUÇÃO.....	36
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	38
4.2.1. Síntese da 4-(6-MERCAPTOPURINA)-7-CLOROQUINOLINA.....	38
4.2.2. Teste Preliminar dos efeitos adversos do derivado da cloroquina sobre <i>Gallus gallus</i>.....	38
4.2.3. Imunossupressão da ave.....	39
4.2.4. Preparo das aves para o teste da droga.....	39
4.2.5. Inoculação das aves e delineamento experimental	40
4.2.6. Análise Estatística.....	41
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
4.3.1. Teste preliminar dos efeitos adversos do derivado da cloroquina sobre <i>Gallus gallus</i>.....	42
4.3.2. Inoculação das aves.....	42
4.3.3. Estádios eritrocíticos.....	42

4.3.4. Pico máximo de parasitemia, número de parasitos e período pré-patente.....	43
4.3.5. Curva de Temperatura corporal e Correlação com a Parasitemia.....	45
4.3.6. Curva de hematócrito e Correlação com a Parasitemia.....	46
4.3.7. Estado clínico das aves no curso da infecção.....	47
4.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
5. CONCLUSÕES GERAIS.....	51
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Prevalência de <i>Plasmodium juxtenucleare</i> em diversas localidades brasileiras.....	4
Quadro 2. Vias de inoculação experimentais e período de pré-patência observados por diferentes autores.....	5
Quadro 3. Vias de inoculação e quantidade de sangue parasitado por <i>Plasmodium juxtenucleare</i> inoculado em quatro grupos experimentais formados por <i>Gallus gallus</i>	23
Quadro 4. Grupos experimentais e seus respectivos números de animais.....	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Parasitemia da ave controle (não imunossuprimida) e parasitemia média do grupo imunossuprimido ao longo do experimento.....	1
Figura 2. Trofozoítos (a), esquizontes (b) e gametócitos (c) no grupo imunossuprimido e na ave controle ao longo do experimento.....	14
Figura 3. Peso da ave controle e peso médio do grupo imunossuprimido ao longo do experimento.....	15
Figura 4. Temperatura na ave controle e temperatura média no grupo imunossuprimido ao longo do experimento.....	17
Figura 5. Média do número de parasitos em <i>Gallus gallus</i> inoculados por via intraperitoneal com sangue infectado por <i>Plasmodium juxtannucleare</i> nas dosagens de 0,3mL e 0,5mL.....	25
Figura 6. Média do número de parasitos em <i>Gallus gallus</i> inoculados por via intramuscular com sangue infectado por <i>Plasmodium juxtannucleare</i> nas dosagens de 0,3mL e 0,5 mL.....	26
Figura 7. Média do número de parasitos em <i>Gallus gallus</i> inoculados por vias intraperitoneal e intramuscular com sangue infectado por <i>Plasmodium juxtannucleare</i> na dose de 0,3mL	27
Figura 8. Média do número de parasitos em indivíduos inoculados por vias intraperitoneal e intramuscular com sangue infectado por <i>Plasmodium juxtannucleare</i> na dose de 0,5mL.....	27
Figura 9. Média do número de parasitos em <i>Gallus gallus</i> inoculados por vias intraperitoneal e intramuscular com sangue infectado por <i>Plasmodium juxtannucleare</i> nas dosagens de 0,3mL e 0,5mL.....	28
Figura 10. Número total e percentual de formas eritrocíticas de <i>Plasmodium juxtannucleare</i> em galinhas inoculadas pelas vias intraperitoneal e intramuscular com 0,3mL e 0,5mL de sangue, quantificados em 12 observações ao longo de 36 dias após a infecção.....	29

Figura 11. Estrutura química das principais drogas usadas no tratamento de <i>Plasmodium</i> spp.....	36
Figura 12. Estrutura química da 4-(6-MERCAPTOPURINA)-7-CLOROQUINOLINA.....	37
Figura 13. Rota sintética da 4-(6-MERCAPTOPURINA)-7-CLOROQUINOLINA.....	38
Figura 14. Condições das aves em laboratório.....	39
Figura 15. Estádios eritrocíticos de <i>Plasmodium juxtannucleare</i> encontrados em <i>Gallus gallus</i> infectados experimentalmente.....	43
Figura 16. Número médio de formas eritrocíticas em grupos de aves inoculadas experimentalmente com <i>Plasmodium juxtannucleare</i>	45
Figura 17. Valores totais de parasitos encontrados em cada grupo do 10º ao 30º dia do experimento.....	45
Figura 18. Médias de temperatura corporal das aves dos grupos estudados ao longo do experimento.....	46
Figura 19. Valores percentuais de hematócrito nas aves ao longo do experimento.....	47

RESUMO

Plasmodium juxtannucleare é o agente causador da malária aviária que ocorre em alguns estados do Brasil. Esta malária está relacionada a diversos sinais clínicos e pode causar danos em criações rústicas de aves. O modelo aviário já foi utilizado para a investigação de drogas no combate à malária e hoje em dia o modelo mais utilizado é o *Plasmodium berghei* em roedores. A busca por anti-maláricos e malaricidas é de extrema relevância. O objetivo deste trabalho foi verificar o efeito da 4-(6-MERCAPTOPURINA)-7-CLOROQUINOLINA, uma substância recém sintetizada a partir da cloroquina, sobre a malária aviária em *Gallus gallus* e aprimorar o modelo aviário para testes de potenciais malaricidas. Para o encontro de uma ave doadora, foram visitadas no município de Juiz de Fora duas granjas e feitos esfregaços sangüíneos de 30 aves. A prevalência foi de 100%. Dentre as 30 aves examinadas, as seis com os maiores valores de parasitemia foram adquiridas e levadas para o laboratório. Para verificar qual o melhor dia para a retirada de sangue de aves infectadas e imunossuprimidas pelo acetato de metilprednisolona, cinco das seis aves receberam em dose única este imunossupressor e uma serviu como controle. A parasitemia das aves foi acompanhada por 26 dias após o dia da imunossupressão, por meio de esfregaços sangüíneos preparados a cada dois dias. Também foram aferidos o peso e temperatura corporal e feitos microhematócritos sangüíneos. Verificou-se que ao 10º dia pós-imunossupressão ocorreu pico de parasitemia. Houve queda de peso corporal e correlação com a parasitemia. Ocorreu pouca variação na temperatura corporal e hematócrito e não houve correlação destes com a parasitemia. Em outras oito aves adquiridas em casa comercial com 15 dias de idade, foram realizadas infecções experimentais com sangue inoculado via intramuscular e via intraperitonal nas doses de 0,3mL e 0,5mL para as duas vias. Durante um mês as aves tiveram o valor médio de parasitos acompanhado para comparar qual a via mais efetiva e se havia diferença entre as doses testadas no estabelecimento da infecção. Não foi observada diferença entre as

dosagens, mas foi possível verificar que a infecção via intraperitoneal atinge mais rapidamente o pico de parasitemia, com médias de parasitos mais altas, entretanto ao fim do experimento o número total de parasitos quase não diferiu entre as doses e vias. Para testar o efeito malaricida da 4-(6-MERCAPTOPURINA)-7-CLOROQUINOLINA, uma droga derivada da cloroquina, recém sintetizada, foram infectados 45 pintos, Leghorn branco, via intramuscular. As aves foram separadas em quatro grupos experimentais com 15 aves por grupo (Grupo 1- não infectado, Grupo 2- infectado e sem tratamento, Grupo 3- infectado e tratado com a cloroquina e grupo 4- infectado e tratado com o derivado da cloroquina). A droga foi administrada via gavagem por 4 dias consecutivos na dose de 100mg/Kg de peso vivo. Para a avaliação do efeito malaricida da droga, as aves tiveram o número médio de parasitos encontrados acompanhados por esfregaços sanguíneos feitos a cada dois dias após o décimo dia da inoculação. Também foram aferidos o peso e temperatura corporal a cada dois dias e hematócrito a cada quatro dias. O derivado da cloroquina teve atividade malaricida, mantendo a parasitemia mais baixa em relação ao grupo controle não tratado e ao grupo controle tratado com a cloroquina. Entretanto em todos os grupos a parasitemia se manteve baixa. Sugere-se a investigação da ação malaricida desta droga em modelos com *P. berghei* ou culturas com *P. falciparum*.

Palavras-chave: malaricida, cloroquina, malária aviária.

ABSTRACT

Plasmodium juxtancleare is the agent of the avian malaria that occurs in some states of Brazil. This malaria is related to several clinical signs and it can cause damages in the poultry section. The aviary model was already used for the investigation of drugs in the combat to the malaria and nowadays the model more used is the *Plasmodium berghei* in rodents. The search for anti-malarial drugs is of extreme importance. The aim of this study was to accomplish experimental infections of *Plasmodium juxtancleare* in *Gallus gallus* and to test a substance recently synthesized, the 4-(9H-purin-6-ylthio)-7-cloroquinoline, derived of the cloroquine, to verify their effects on the avian malaria and to improve the aviary model for these types of tests. For a bird donor's encounter, two chicken farms were visited in the Juiz de Fora city and blood smears made in 30 hens. The prevalence was 100%. Among the 30 examined hens, six with the largest parasitemia values had been acquired and taken to the laboratory. To verify which the best day to retreat the blood to infected hens, five of the six hens received only dose of the imunossupressor substance (metilprednisolon acetate) and one served as control. The parasitaemia of the hens was accompanied by 26 days after the day of the imunossuppression, through blood smears prepared each two days. The weight and corporal temperature were checked and made blood hematocrits. It was verified that to the 10th day powder-imunossuppression it happened parasitaemia pick. There were fall of body weight and correlation with the parasitaemia. There was a little variation in the body temperature and hematocrite and there was not correlation of these with the parasitaemia. In other eight acquired hens in commercial house with 15 days old, experimental infections were accomplished with blood inoculated through intramuscle and intraperitoneally in the 0,3mL and 0,5mL for the two routes. During one month the hens had the value of parasites accompanied to compare which the most effective route and difference among the doses tested in the establishment of the infection. Significant difference was not observed among the

doses but it was possible to verify that the infection through intraperitoneal reaches the parasitemia pick more quickly, with higher averages of parasites, however to the end of the experiment the total number of parasites differed hardly between the doses and routes. To test the effect a derived drug of the cloroquine, 45 chicks were infected, white Leghorn, through intramuscle route . The hens were separate in four experimental groups, 15 chicks for group (Group1 - no infected, Group 2 - infected and without treatment, Group 3 - infected and treated with the cloroquine and Group 4 - infected and treated with derived of the cloroquine) The drug was administered four consecutive days in the 100mg/Kg of alive weight dose. For the evaluation of the antimalarial effect of the drug, the hens had the number of parasites accompanied by blood smears done each two days after the tenth day of the inoculation. Also the weight and corporal temperature were checked each two days and hematocrit four days. Derived of the cloroquine had antimalarial activity, reducing the number of parasites and maintaining the lowest parasitaemia in relation to the group not treated and to the group treated with cloroquine.

Key words: antimalarial, cloroquine, avian malaria

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Malária em aves e *Plasmodium juxtannucleare*

Plasmodium (Novyella) juxtannucleare Versiani & Gomes, 1941 e *Plasmodium (Haemamoeba) gallinaceum* Brumpt, 1935 são espécies de plasmódios causadores de malária aviária, sendo estas as únicas que infectam naturalmente galinhas domésticas (MASSARD & MASSARD, 1981).

O *Plasmodium (Haemamoeba) gallinaceum* é de ocorrência restrita ao Velho Mundo (GARNHAM, 1966) e o *Plasmodium (Novyella) juxtannucleare* ocorre em vários países do Novo Mundo (DHANAPALA, 1962). Este parasito foi primeiramente identificado no Brasil ocorrendo em galinhas domésticas adquiridas no mercado municipal da cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais por Peres & Gomes em agosto de 1940 (GARNHAM, 1966), sendo descrito por Versiani & Gomes, em 1941. Neste mesmo ano BELTRÁN, 1941 registrou *P. juxtannucleare* em Chiapas, México.

Este parasito foi assim denominado pelo fato da freqüente justaposição deste em relação ao núcleo das células parasitadas. As formas eritrocíticas são de pequenas dimensões e apresentam certa especificidade para *Gallus gallus* (VERSIANI & GOMES, 1941; 1943).

ISHIGURO (1957) descreveu uma espécie de plasmódio aviário como uma nova espécie e a denominou de *Plasmodium japonicum*, entretanto AKIBA (1959), por meio de estudos morfológicos e biológicos, verificou que *P. japonicum* é sinônimo de *P. juxtannucleare*.

A malária em galinhas causada por *P. juxtannucleare* é uma infecção que causa morbidade e mortalidade, sendo responsável por perdas econômicas no setor da avicultura. Pode causar quadro de anemia, febre, inapetência, congestão e megalia de órgãos, distúrbios digestivos e neurológicos e, nos casos de altas parasitemias, prostração e morte (DHANAPALA, 1962; KRETTLI, 1972; MASSARD & MASSARD, 1981; SOUZA, 1998 & SOARES *et al.* 1999). Em criações comerciais foi relacionada com a queda na produção de ovos (MASSARD, 1982). Na sua fase aguda a ave pode apresentar sintomas neurológicos decorrentes de lesões cerebrais e na medula espinhal, levando à falta de coordenação motora, fraqueza acentuada nas pernas, podendo eventualmente levar à paralisia. Também foram observados distúrbios sistêmicos como perda de apetite, emaciação (AL DABAGH, 1961), diarreia com fezes sanguinolentas e

anemia, evoluindo em casos mais severos para morte (SERRA-FREIRE & MASSARD, 1979).

Entretanto, BARRETO (1943), PARAENSE (1947) MOTA *et al.* (1998), e KRETTLI (1971) sugeriram que a malária aviária, causada por *P. juxtannucleare*, seja crônica, assintomática e raramente fatal.

Plasmodium juxtannucleare tem alta especificidade para *G. gallus*, com alta prevalência em aves de criações rústicas (VERSIANI & GOMES, 1941; BELTRÁN, 1941, PARAENSE, 1947; KRETTLI, 1972; MASSARD & MASSARD, 1981). Além da galinha doméstica, há registros de outras aves parasitadas por *P. juxtannucleare*: *Gallus lafayettei* (jungle-fowl) no Ceilão (DISSANAIKE, 1963), *Bambusicola thoracica sonorivox* (perdiz de bambu) em Taiwan (MANWELL, 1966), *Francolinus spp* (perdiz) na África (MOHAN & MANWELL, 1966); *Crysolophus pictus* (faisão dourado), *Lophura nyctemera* (faisão prateado), *C. amherstiae* (faisão lady) e *Phasianus colchicus* (faisão coleiro) no Brasil (MASSARD & MASSARD, 1981) e *Meleagris galopavo* (peru) também no Brasil (SERRA-FREIRE & MASSARD, 1979).

No hospedeiro vertebrado ocorrem as fases exoeritrocítica (pela inoculação dos esporozoítos presentes nas glândulas salivares do mosquito infectado na corrente circulatória da ave, com invasão dos esporozoítos nas células do sistema fagocítico mononuclear e posterior penetração dos criptozoítos em células endoteliais de vários órgãos, como o fígado) e eritrocítica (pela penetração dos merozoítos nas hemácias e formação de trofozoítos) (MC GHEE *et al.*, 1988).

Plasmodium juxtannucleare tem como hospedeiros invertebrados mosquitos da tribo Cullicini (VERSIANI & GOMES, 1941; BENNET *et al.*, 1966; GARNHAM, 1966; KRETTLI, 1972; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA & CASTRO, 1991).

Experimentalmente, PARAENSE (1944) assinalou a ocorrência de esporozoítos em dois exemplares de *Culex quinquefasciatus*. BENNET *et al.* (1966) conseguiram com grande índice de positividade infectar *C. gelidus*, *C. tritaeniorrhynchus* e *C. pseudovishnui*.

Na Malásia, BENNET *et al.* (1966) descreveram estágios esporogônicos de *P. juxtannucleare* em *C. sitiens* e *C. annulus* naturalmente infectados.

KRETTLI (1972) estudou a infecção experimental em *C. quinquefasciatus*, demonstrando o oocisto pedunculado no estômago do mosquito.

LOURENÇO-DE-OLIVEIRA & CASTRO (1991) estudando os possíveis vetores de *P. juxtannucleare*, capturaram mosquitos no Rio de Janeiro. As seguintes espécies estavam infectadas: *C. saltanensis*, *C. declarator*, *C. coronator*, *C.*

quinquefasciatus e *C. bidens*. Segundo os autores *C. saltanensis* foi o mais freqüente em galinhas.

Nos mosquitos ocorre a fase esporogônica do ciclo pela ingestão de gametócitos presentes no sangue das aves, maturação destes no estômago do mosquito e fertilização, originando o zigoto móvel, que atravessa o epitélio do estômago, encistando-se e formando oocisto. O oocisto, por esporogonia, produz esporozoítos que por movimentos da hemolinfa chegam às glândulas salivares do mosquito dando continuidade ao ciclo (GARNHAM, 1966).

Quanto à morfologia deste hemoparasito, VERSIANI & GOMES (1941) descreveram o *P. juxtannucleare* como parasito de pequenas dimensões e freqüentemente justaposto ao núcleo das hemácias. MASSARD (1982) e ELISEI (2001) também fizeram caracterizações morfológicas e morfométricas deste parasito. Abaixo estão as caracterizações morfométricas e morfológicas realizadas por ELISEI (2001), para parasitos do isolado MSS-47 de *P. juxtannucleare* (foram mensurados o diâmetro maior x diâmetro menor e calculado o índice morfométrico- IM):

Os **trofozoítos** tiveram em média $1,802 \pm 0,313 \times 1,230 \pm 0,208 \mu\text{m}$ com $\text{IM} = 0,623 \pm 0,110$. Estes eram arredondados, com predomínio das formas ovóides e elípticas.

Os **esquizontes** estimaram em média $2,809 \pm 0,187 \times 1,820 \pm 0,386 \mu\text{m}$ com $\text{IM} = 0,643 \pm 0,120$. Os esquizontes eram em formas ovóides, elíptica, piriforme e amebóide, com predomínio das formas ovóides e piriformes. Em geral, apresentaram dois, três ou quatro merozoítos.

Os **macrogametócitos** mediram em torno de $3,559 \pm 0,883 \times 2,363 \pm 0,207 \mu\text{m}$ com $\text{IM} = 0,766 \pm 0,078$. Foram observadas formas ovóides, elípticas e piriformes, com predomínio das ovóides e piriformes.

Os **microgametócitos** tiveram em média $3,891 \pm 0,946 \times 2,386 \pm 0,783 \mu\text{m}$ com $\text{IM} = 0,505 \pm 0,103$. Foram observadas formas ovóides, elípticas e piriformes, com predomínio das ovóides e elípticas.

A ocorrência de *P. juxtannucleare* é ampla e no Brasil já houve registros em alguns estados como Minas Gerais (PARAENSE, 1949; KRETTLI, 1972; SANTOS-PREZOTO *et al.*, 2004; VASHIST *et al.* 2003, VASHIST, 2006), Pará (SERRA-FREIRE & MASSARD, 1976), Mato Grosso do Sul (SERRA-FREIRE & MASSARD, 1979), Espírito Santo (MASSARD & MASSARD, 1981), Rio de Janeiro (SOARES *et al.*, 1999) e Pernambuco (MOTA *et al.*, 2000). Estudos revelaram sua presença também

em outros países da América Latina (BELTRÁN, 1941), Ásia (DHANAPALA, 1962) e África (MOHAN & MANWELL, 1969).

As prevalências de *P. juxtannucleare* no Brasil estão assinaladas no Quadro 1:

Quadro1: Prevalência de *Plasmodium juxtannucleare* em diversas localidades brasileiras

Localidades	Prevalências (%)	Autor
Minas Gerais		
Japão de Oliveira	16,6%	PARAENSE (1944)
Bambuí	21,47%	PARAENSE (1949)
Caratinga	1,4%	FERRAZ-FRANCO (1954)
Diversas regiões	4 – 33%	KRETTLI (1971)
Lambari	6%	MASSARD (1976)
Santa Bárbara do Tugúrio	100%	SANTOS-PREZOTO (2004)
Juiz de Fora	53%	VASHIST <i>et al.</i> (2003)
Rio de Janeiro		
Cordeiro, Laranjal, Sto. Antônio de Pádua	2%	FERRAZ-FRANCO (1954)
Diversas regiões	32,3%	MASSARD (1976)
Diversas regiões	35,5%	SOUZA (1998)
Espírito Santo		
Alegre	39,2%	MASSARD (1976)
Pernambuco		
Recife	51,4%	MOTA <i>et al.</i> (2000)
Pará		
Belém	40%	SERRA-FREIRE <i>et al</i> (1976)

Segundo COX (1994) e PIERCE & BENNET (1996) *P. juxtannucleare* possui a seguinte sistemática:

Reino: Protozoa, **Sub-Reino:** Alveolata, **SuperPhylum:** Apicomplexa, **Phylum:** Sporozoa, **Classe:** Haemosporidea, **Ordem:** Haemosporidida, **Família:** Plasmodiidae, **Gênero:** *Plasmodium*, **Sub-Gênero:** *Plasmodium (Novyella)*, **Espécie:** *Plasmodium (Novyella) juxtannucleare*.

Segundo SOARES *et al* (1999) as características observadas em estudos feitos a respeito da esquizogonia exoeritrocítica plasmática em *P. juxtannucleare* levam a crer que esta é uma espécie de plasmódio evolutivamente intermediária entre os plasmódios de répteis e os de mamíferos.

BENNET (1970), estudando a seqüência evolutiva dos sub-gêneros dos plasmódios aviários *Haemamoeba*, *Giovannolaia* e *Novyella*, concluiu que *Novyella* era o mais evoluído, devido à sua especificidade em relação aos hospedeiros vertebrados e invertebrados, redução do número de merozoítos, redução do tamanho do parasito e grau de distorção da célula hospedeira. O autor cita que a espécie de *P. juxtannucleare* é a mais diferenciada, devido ao fato de possuir oocistos especializados, grandes e pedunculados.

O período de pré-patência pode variar de acordo com as vias de inoculação experimentais (Quadro 2)

Quadro 2. Vias de inoculação experimentais e período de pré-patência observados por diferentes autores.

Vias de inoculação	Período Pré-patente	Autores
Intramuscular	6- 20 dias	VERSIANI & GOMES (1943)
	76-106 dias	BÉLTRAN (1943)
	7-14 dias	BARRETO (1943)
Endovenosa	4-15 dias	VERSIANI & GOMES (1943)
	38 dias	BÉLTRAN (1943)
	7-14 dias	BARRETO (1943)
Intraperitoneal	11-18 dias	DHANAPALA (1962)
	4-8 dias	MASSARD (1981)
	12 dias	OLIVEIRA (2001)
	17 dias	AMARAL (2005)

Quanto aos métodos de exacerbação da parasitemia por *P. juxtannucleare*, AL DABAGH (1960) realizou esplenectomia em frangos durante a fase crônica da doença e observou o avanço da parasitemia dois a três dias depois da retirada do baço das aves, o que as levou à morte. KRETTLI (1971) também realizou a técnica de esplenectomia em frangos e observou uma parasitemia de até 61%, entre o quarto e sexto dia após a intervenção cirúrgica, com perda de metade das aves estudadas. Esta mesma autora

irradiou aves com cobalto e raios-X, o que resultou na elevação da parasitemia acima de 40%, em outro teste foi administrado o acetato de delta-hidro cortisona a 2,5%, via intramuscular, obtendo-se a parasitemia de 24% com posterior óbito das aves. SOUZA (1998) injetou o acetato de metilprednisolona, em dose única, no músculo peitoral das aves e elevou a parasitemia de 0,34% para 33,4% em 16 dias.

As amostras de *P. juxtannucleare* em geral, são mantidas através de passagens sanguíneas sucessivas em aves jovens, por vias endovenosa, intramuscular e intraperitoneal, utilizando-se com frequência as dosagens de 0,5mL ou 1mL de sangue infectado, com intervalos de 15 a 30 dias. (VERSIANI & GOMES, 1943; KRETTLI, 1971; MASSARD & MASSARD, 1981; SOUZA, 1998).

1.2. Drogas anti-maláricas e modelos experimentais

Plasmodium juxtannucleare já foi utilizado em testes com a quinina. A droga foi administrada oralmente por gavagem. As aves jovens tratadas com a quinina não apresentaram infecção eritrocítica significativa mas, morreram duas semanas após a inoculação pela oclusão dos capilares cerebrais devido aos parasitos, ou seja, a quinina não teve atuação sobre as formas exoeritrocíticas de *P. juxtannucleare* (PARAENSE, 1947).

AMARAL (2005) testou a cloroquina e os flavonóides, quercetina e rutina, em infecções experimentais por *P. juxtannucleare* em pintos da raça Leghorn Branca e observou que apenas a cloroquina teve atividade antimalárica sobre o parasito, entretanto, em relação ao ganho de peso das aves e variações do hematócrito, destacou-se a quercetina como droga que tendeu a melhorar o estado clínico das aves.

Segundo MC GHEE *et al.* (1988), os primeiros modelos utilizados para testes de potenciais antimaláricos foram canários infectados por *Plasmodium relictum*. BISHOP *et al.* (1947) utilizaram este modelo para testar a eficácia da pamaquina, quinina e mepacrina em estágios eritrocíticos do parasito. *Plasmodium gallinaceum* também já foi utilizado para testes de drogas sobre formas sanguíneas.

Entretanto, as espécies aviárias de plasmódio cederam lugar ao *Plasmodium berghei*, parasito de roedores, na avaliação de substâncias antimaláricas (BRANDÃO *et al.*, 1985; FIDOK *et al.*, 2004). Este tem sido considerado um modelo funcional e prático. Existem relatos de testes de substâncias anti-maláricas em primatas, que teoricamente forneceriam uma indicação mais clara sobre a eficácia da droga em humanos (WENGELNIK *et al.*, 2002), mas são modelos bem pouco práticos. Os ensaios *in vitro*

são bastante utilizados e se baseiam no cultivo de *Plasmodium falciparum*, a espécie de plasmódio humano que oferece maior resistência às drogas (CHILDS *et al.*, 1984).

Portanto, constata-se a existência de uma série de modelos experimentais com a finalidade de testar substâncias antimaláricas.

A cloroquina é a droga mais comumente utilizada no tratamento da malária. É um fármaco pertencente ao grupo das 4- aminoquinolinas e se tornou o principal substituto da quinina após a Segunda Guerra Mundial. Possui eficácia contra plasmódios humanos, é barata e acessível (KRETTLI *et al.*, 2001).

Entretanto, há registros de resistência de parasitos à cloroquina, o primeiro deles foi assinalado na Tailândia em 1957 e logo a seguir em 1961 na América do Sul, inclusive no Brasil (resistência do *P. falciparum* à cloroquina). A resistência do parasito também ocorreu rapidamente com o uso de sulfamídicos associados a pirimetamina e mesmo com drogas mais recentes, como a mefloquina e o halofantrine. Quanto ao quinino, vários trabalhos mostram que o *P. falciparum*, ainda que lentamente, vem apresentando níveis decrescentes de sensibilidade ao tratamento e as tentativas de induzir imunidade com vacinas ainda são experimentais. Pacientes com malária, no entanto, desenvolvem gradualmente imunidade que modifica consideravelmente a evolução clínica da doença (PINNELI, 1999).

A necessidade de descobrir novas terapias capazes de eliminar as doenças sem atingir o hospedeiro, motivou o pesquisador Adilson David da Silva, da Universidade Federal de Juiz de Fora, a sintetizar uma série de análogos tal como o 4-(6-MERCAPTOPURINA)-7-CLOROQUINOLINA, entre outros derivados substituídos na posição 4 do grupo quinolina. Os fármacos sintetizados por este pesquisador têm sido testados em outros protozoários além de plasmódios com resultados ainda a serem descritos na literatura.

2. Capítulo I

BUSCA POR AVES NATURALMENTE INFECTADAS POR *Plasmodium juxtannucleare* (Novyella) juxtannucleare (HAEMOSPORIDA, PLASMODIIDAE) : IMUNOSSUPRESSÃO E PARASITEMIA

RESUMO

Este trabalho teve por objetivos localizar aves naturalmente infectadas por *Plasmodium juxtannucleare* e avaliar o efeito da imunossupressão por corticóide sobre a parasitemia de *Plasmodium juxtannucleare* em *Gallus gallus*, procedentes de granjas do município de Juiz de Fora, MG e verificar a correlação da parasitemia com peso, temperatura corporal e microhematócrito. Foram feitos esfregaços sangüíneos com sangue coletado de 30 galinhas, 24 criadas em confinamento e seis criadas de forma rústica. As amostras de sangue foram obtidas por perfuração da veia radial. Os esfregaços sangüíneos foram analisados em microscópio fotônico, 100 campos por animal sob lente de imersão (1000X). Foram estimadas a prevalência dos locais visitados e a parasitemia das aves. As seis galinhas que demonstraram maiores valores de parasitemia foram adquiridas e levadas para o laboratório. Cinco destas foram imunossuprimidas e uma serviu como ave controle. A parasitemia das aves foi acompanhada por 26 dias após o dia da imunossupressão, por meio de esfregaços sangüíneos preparados a cada dois dias, quantificando-se diferencialmente os estádios eritrocíticos. Foram aferidos, a cada dois dias, a temperatura e o peso corporal das aves e o hematócrito, a cada sete dias, por meio da técnica de microhematócrito. Correlacionaram-se parasitemia e temperatura, parasitemia e peso e parasitemia e microhematócrito. A prevalência foi de 100% nas granjas e os valores de parasitemia variaram entre 5 e 10%. Ao décimo dia após a imunossupressão houve o pico máximo de parasitemia (19%). Houve queda de peso corporal e correlação com a parasitemia. Ocorreu pouca variação na temperatura corporal e hematócrito e não houve correlação destes com a parasitemia.

Palavras-chave: Malária aviária, hemoparasitos, galinhas

2.1 INTRODUÇÃO

Plasmodium juxtannucleare Versiani & Gomes, 1941 é uma de muitas espécies de plasmódios causadoras da malária aviária em galiformes e junto com *Plasmodium gallinaceum* Brumpt, 1935, são as únicas a infectarem naturalmente galinhas domésticas (MASSARD & MASSARD, 1981).

A infecção causada pelo *P. juxtannucleare* pode causar anemia, febre, inapetência, congestão e megalia de órgãos, distúrbios digestivos e neurológicos e, nos casos de alta parasitemia, prostração e morte (DHANAPALA, 1962; KRETTLI, 1972; MASSARD & MASSARD, 1981; SOUZA, 1998). Em criações comerciais foi relacionada com a queda na produção de ovos (MASSARD, 1982). Na sua fase aguda a ave pode apresentar sintomas neurológicos, decorrentes de lesões cerebrais e na medula espinhal, levando à falta de coordenação motora, fraqueza acentuada nas pernas, podendo eventualmente levar a paralisia. Também foram observados distúrbios sistêmicos como perda de apetite, emaciação (AL DABAGH, 1961), diarreia com fezes sanguinolentas, e anemia, evoluindo em casos mais severos para morte (SERRA-FREIRE & MASSARD, 1979).

A ocorrência de *P. juxtannucleare* é ampla no Brasil e já houve registros no estado de Minas Gerais (VERSIANI & GOMES, 1941, 1943; PARAENSE, 1949; FERRAZ-FRANCO *et al* , 1954; KRETTLI, 1972; VASHIST *et al*, 2003; SANTOS-PREZOTO *et al*, 2004)

Em alguns estudos realizados sobre a biologia de *Plasmodium juxtannucleare* foram executados métodos para a exacerbação da parasitemia em galinhas, como a retirada do baço (AL DABAGH, 1960; KRETTLI, 1971), irradiação por cobalto e raio X, administração do acetato de delta-hidrocortisona a 2,5%, via intramuscular (KRETTLI, 1971) e a injeção do acetato de metilprednisolona, em dose única, no músculo peitoral (SOUZA, 1998). Todos estes procedimentos, em graus diferentes, resultaram na elevação da parasitemia dos hospedeiros.

O objetivo deste trabalho foi localizar aves *Gallus gallus* naturalmente infectadas por *Plasmodium juxtannucleare* e avaliar o efeito da imunossupressão por corticóide sobre a parasitemia de *Plasmodium juxtannucleare* em *Gallus gallus*, procedentes do bairro Graminha, município de Juiz de Fora, MG, naturalmente infectadas, bem como verificar a correlação entre a parasitemia com peso, temperatura corporal e microhematócrito.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1. Busca por aves naturalmente infectadas por *Plasmodium juxtannucleare*

Em abril de 2006 foram visitadas duas granjas no bairro Graminha, município de Juiz de Fora, MG, para a obtenção de aves naturalmente infectadas por *Plasmodium juxtannucleare*. Em trabalho anterior realizado neste local (VASHIST *et al.*, 2003), relatou-se prevalência de 53% em trinta aves examinadas.

Na granja 1 (21° 47' 41" S; 43° 19' 49" W), foram examinadas seis aves, sendo um macho e cinco fêmeas, sem raça definida e criadas de maneira rústica. Na granja 2 (21° 47' 39" S; 43° 20' 01" W), foram examinadas 24 aves fêmeas da raça Zobral, mantidas em galinheiros e alimentadas com ração. As amostras de sangue foram obtidas por perfuração da veia radial, fixados em metanol por 3 minutos, no próprio local de coleta e identificadas.

Todas as aves amostradas tiveram aferidos o peso e a temperatura corporal. Foram anotadas características corporais como cor da plumagem, marcas na crista ou pernas que pudessem auxiliar na posterior identificação dos indivíduos e aquisição dos que apresentassem parasitemias mais elevadas.

No Laboratório de Microscopia do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Comportamento e Biologia Animal – da Universidade Federal de Juiz de Fora (PPGCB CBA/UFJF), os esfregaços sanguíneos foram corados por Giemsa (Eosina Azul de Metileno - MERCK®), durante aproximadamente 50 minutos e examinados 100 campos por animal, sob lente de imersão em microscópio fotônico (1000x). Para a identificação dos estádios eritrócíticos de *P. juxtannucleare* foram utilizadas as descrições e observações de VERSIANI & GOMES (1941, 1943), KRETTLI (1972), MASSARD (1982) e ELISEI (2001, 2005).

A prevalência em cada granja foi calculada segundo MARGOLIS *et al.*, (1982):

$$\text{Prevalência} = \frac{\text{nº de hospedeiros infectados}}{\text{nº de hospedeiros examinados}} \times 100$$

A parasitemia de cada ave foi calculada conforme proposto por SOUZA (1998):

$$\text{Parasitemia} = \frac{\text{nº de eritrócitos parasitados} \times 100}{10000} \therefore \frac{\text{nº de eritrócitos parasitados}}{100}$$

2.2.3. Escolha das aves para imunossupressão

As aves da granja 1 foram adquiridas e levadas para o Laboratório Avançado de Zoologia do PPGCBCBA/UFJF. Estas aves foram escolhidas por apresentarem os maiores valores de parasitemia dentre as 30 amostradas.

Para exacerbar a parasitemia das aves, foi injetado no músculo peitoral, em dose única, 26 mg/Kg de acetato de metilprednisolona (SOUZA, 1998) em cada ave.

Objetivando-se comparar a parasitemia natural destas aves em relação àquelas imunossuprimidas, foi escolhida, dentre as seis aves deste experimento, uma que serviu como controle e não recebeu a droga imunossupressora. A parasitemia das aves foi acompanhada por 26 dias após o dia da imunossupressão, por meio de esfregaços sanguíneos preparados a cada dois dias, quantificando-se diferencialmente os estádios eritrocíticos.

2.2.3. Correlação da Parasitemia das aves imunossuprimidas com Temperatura, Peso e Microhematócrito

Além do acompanhamento da parasitemia, foram aferidos, a cada dois dias, a temperatura corporal e o peso corporal das aves e o hematócrito, a cada sete dias, por meio da técnica de microhematócrito.

Para verificar a existência de correlação entre parasitemia e temperatura, parasitemia e peso e parasitemia e microhematócrito foram realizados testes de correlação de Spearman (Intervalo de confiança de 95%), no programa computacional Biostat 2.0 for Windows.

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1. Prevalência e Parasitemia de *P. juxtannucleare* nas aves das granjas visitadas

Em ambas as granjas estudadas a prevalência foi de 100%. As aves da granja 1 apresentaram valores de parasitemia variando entre 5 e 10%, enquanto as aves da granja 2 exibiram valores de parasitemia abaixo de 5%. Com base nestes resultados as aves da granja 1 foram escolhidas como potenciais doadoras para outros experimentos apresentados nos Capítulos II e III. Estes resultados de prevalência foram superiores àqueles encontrados por VASHIST *et al.*, 2003 (53%), nesta mesma região.

2.3.2. Parasitemia e valores médios de estádios eritrocíticos de *P. juxtannucleare* nas aves submetidas à imunossupressão

Os valores médios de parasitemia das aves imunossuprimidas e do controle podem ser visualizados na Figura 1.

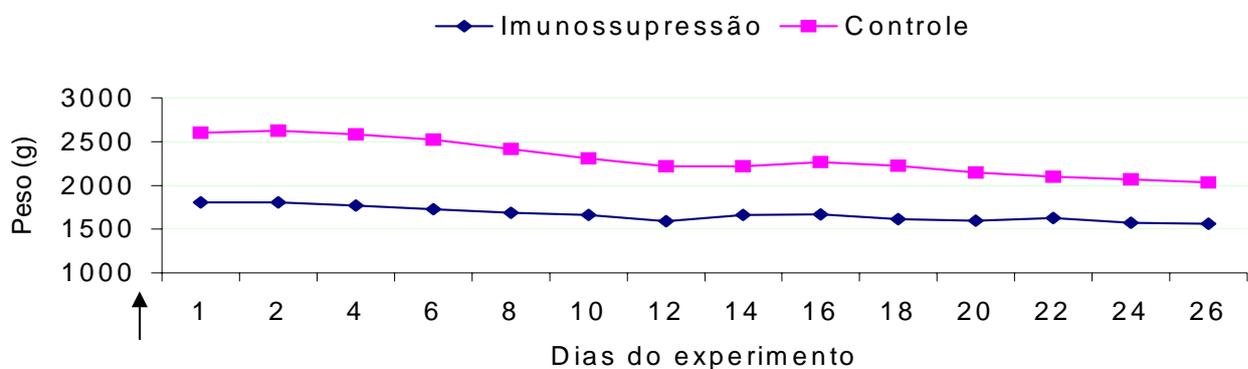


Figura 1. Parasitemia da ave controle (não imunossuprimida) e parasitemia média do grupo imunossuprimido ao longo do experimento (↑ = imunossupressão).

Observou-se que os maiores valores de parasitemia ocorreram nas aves imunossuprimidas durante os primeiros dez dias do experimento, sendo o pico máximo registrado ao décimo dia (19%). Já na ave controle, registraram-se dois picos de parasitemia, com valores que se assemelharam, ao 12º (12%) e ao 16º (10%) dia. A partir do 18º dia, a infecção manteve-se com baixa parasitemia em todas as aves, durante o período acompanhado. SOUZA (1998), relatou elevação da parasitemia de 0,34%

para 33,4% 16 dias após a imunossupressão com o acetato de metil-prednisolona e registrou que após trinta dias o número de parasitos encontrados ficou bastante reduzido. ELISEI (2005), relatou para três cepas estudadas, dos estados do Rio de Janeiro, São Paulo e Minas Gerais, com parasitemia inicial de 0,03%, 0,01% e 0,04% respectivamente, elevação da parasitemia para 13,4%, 8,6% e 14,4%, respectivamente, no 28º dia pós imunossupressão pelo acetato de metilprednisolona. Os dados deste trabalho se assemelham aos encontrados por AMARAL (2005), que ao 15º dia pós imunossupressão pelo mesmo corticóide utilizado neste experimento registrou elevação da parasitemia. O estágio trofozoíto (70%) foi o mais visualizado, seguido por esquizonte (24%) e gametócito (6%), o que corrobora os dados observados em outros trabalhos, tanto em infecções naturais (SOUZA, 1998; VASHIST *et al.* 2003; SANTOS-PREZOTO *et al.*, 2004) quanto experimentais (ELISEI *et al.*, 2001; SILVEIRA, 2005; AMARAL, 2005; VASHIST, 2006). O número médio de trofozoítos, esquizontes e gametócitos detectados na ave controle e nas aves imunossuprimidas, respectivamente, durante os 26 dias deste experimento podem ser visualizadas na Figura 2 (**a, b, c**).

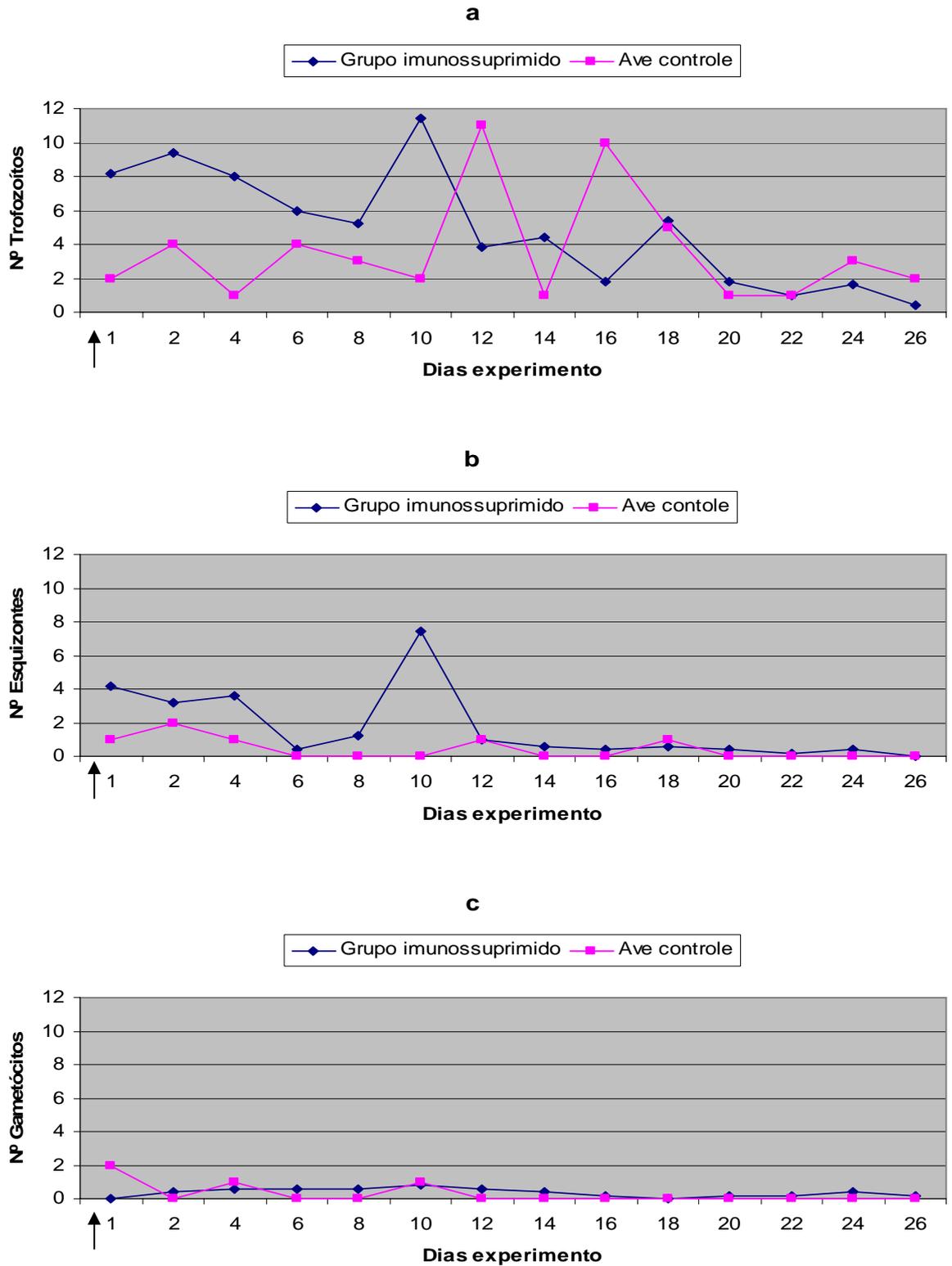


Figura 2. Trofozoítos (a), esquizontes (b) e gametócitos (c) no grupo imunossuprimido e na ave controle ao longo do experimento (↑ = imunossupressão).

Observou-se que para o grupo imunossuprimido o pico máximo do número médio de trofozoítos foi ao décimo dia do experimento, enquanto que para a ave

controle, ao 12º dia e houve um outro pico ao 16º dia. Os maiores números de trofozoítos foram exibidos pelo grupo imunossuprimido, entretanto no último dia do experimento a ave controle apresentava elevado número de trofozoítos.

Quanto ao número de esquizontes observaram-se poucas formas ao longo do experimento tanto na ave controle quanto no grupo imunossuprimido, entretanto no 10º dia ocorreu um pico no grupo imunossuprimido, o que não aconteceu na ave controle.

Foram encontrados poucos gametócitos ao longo deste experimento. Na ave controle o maior valor foi observado no primeiro dia após imunossupressão e a partir do 12º dia essas formas não foram mais registradas. O baixo número de gametócitos encontrados em infecções experimentais já foi registrado por alguns autores (DHANAPALA, 1962; KRETLI, 1971; ELISEI, 2001; AMARAL, 2005), entretanto é importante ressaltar que apesar dos baixos índices encontrados para este estágio eritrocítico, a presença destes na circulação das aves segundo KRETLI (1971), pode explicar a ampla distribuição deste parasito e assegurar sua transmissão.

2.3.3. Peso das aves e Sinais clínicos

O peso médio das aves ao longo do experimento pode ser verificado na Figura 3.

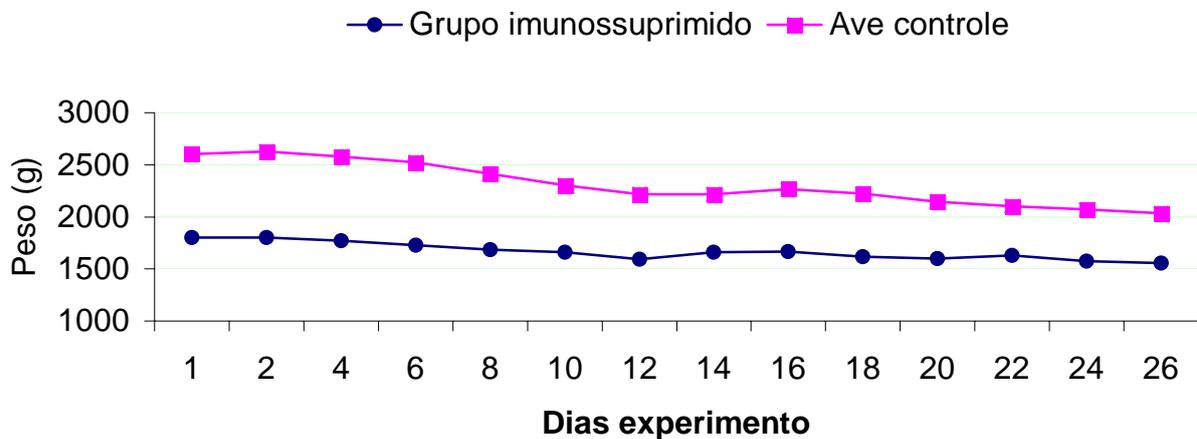


Figura 3. Peso da ave controle e peso médio do grupo imunossuprimido ao longo do experimento.

Foi observada redução do peso tanto na ave controle quanto no grupo imunossuprimido. Houve correlação positiva entre redução do peso e parasitemia (Spearman, $p=0,002$, $r_s=0,737$). AMARAL (2005) trabalhando com avaliação do efeito anti-malárico de flavonóides em infecções por *P. juxtannucleare* relatou queda acentuada do peso em alguns grupos experimentais. Em todas as aves foram observados alguns

sinais clínicos da infecção, como palidez da crista e penas eriçadas, entretanto nas aves imunossuprimidas foi observada diarreia, prostração e diminuição do apetite, provavelmente pela ação do corticóide além dos efeitos da infecção. Os sinais clínicos observados nas aves deste experimento também foram observados em aves infectadas por *P. juxtannucleare* estudadas por AL DABAGH (1961), DHANAPALA (1962); KRETTLI (1972); SERRA-FREIRE & MASSARD (1979), MASSARD & MASSARD (1981); SOUZA (1998). Entretanto, há relato de infecções assintomáticas causadas por este parasito em galinhas, mesmo em altas parasitemias (SANTOS-PREZOTO *et al.*, 2004; AMARAL, 2005; MOTA *et al.*, 1998). É provável que a inapetência das aves, possivelmente relacionada à infecção, associada ao quadro de diarreia tenham comprometido o ganho de peso corporal dos indivíduos no decorrer do período estudado.

2.3.4. Temperatura corporal

Verificou-se pequena variação da temperatura corporal, entre 39,9°C e 40,8°C, exceto ao décimo dia do experimento, no qual a ave controle exibiu a temperatura corporal de 41,2°C, e não houve correlação entre temperatura e parasitemia. A temperatura corporal da ave controle e as médias do grupo imunossuprimido apresentou curva com variação semelhante (Figura 4). Esta variação da temperatura corporal esteve dentro da normalidade para esta espécie de ave que segundo STURKIE (1968) *apud* SOARES (1999) são normais valores iguais ou abaixo de 41,9°C. SOUZA (1998) relatou reação febril constante e significativa em aves experimentalmente infectadas, MASSARD & MASSARD (1981) em uma ave com infecção natural, relatou reação febril baixa e intermitente. VERSIANI & GOMES (1943) consideraram que *P. juxtannucleare* não causa alteração na temperatura corporal das aves, o que também foi observado por AMARAL (2005), SILVEIRA (2005), VASHIST (2006).

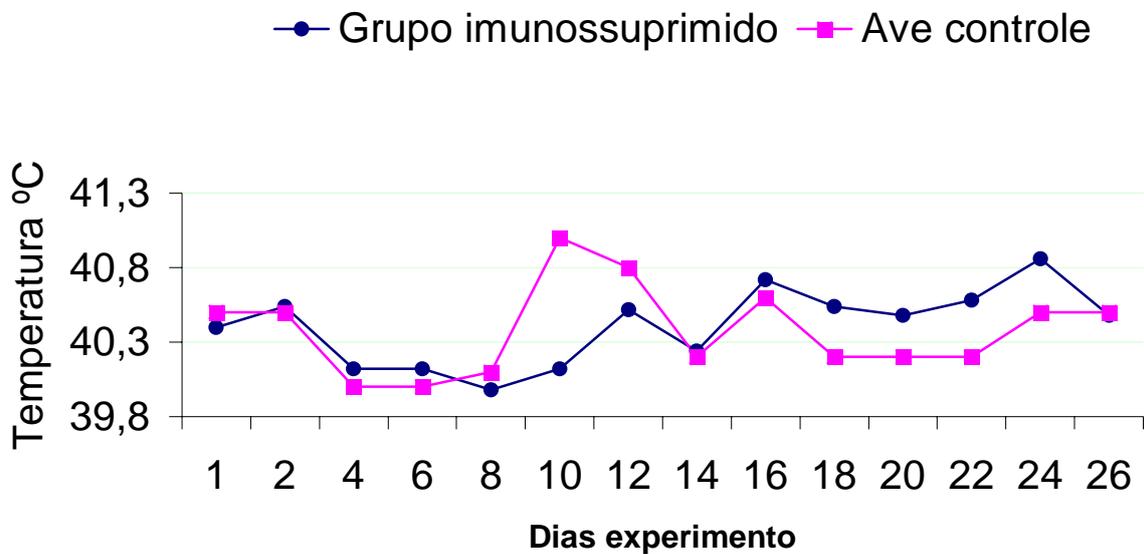


Figura 4. Temperatura na ave controle e temperatura média no grupo imunossuprimido ao longo do experimento.

2.3.5. Hematócrito

Houve pouca variação nos percentuais de hematócrito, registrando-se valores de 28% a 32%, considerados normais para *Gallus gallus* conforme SOUZA (1998) que apontou como valor de referência para hematócritos de galinhas 26,9%.

Não foi possível verificar correlação entre hematócrito e parasitemia tanto para a ave controle quanto para o grupo imunossuprimido ($p > 0,05$). Estes resultados discordam com os obtidos por AMARAL (2005) que encontrou correlação positiva e inversamente proporcional entre os valores percentuais médios de parasitemia e hematócrito em aves experimentalmente infectadas e tratadas com a cloroquina e a quercetina. Segundo CARDOSO & TESSARI (2003) os parâmetros hematológicos podem variar de acordo com a idade das aves, condições ambientais e fatores hormonais, desta forma faz-se necessário um estudo que reúna mais informações a respeito das condições experimentais a que as aves foram submetidas (dieta, estresse e outros) para que possam ser correlacionados aos valores de hematócrito percentual.

2.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL DABAGH, M. A. 1961. Syntomatic partial paralysis in chicks with *Plasmodium juxtannucleare*. **Journal of comparative Pathology**, **71**: 217-221.

AMARAL, K. B. 2005. **Atividade anti-malárica da cloroquina e dos flavonóides quercetina e rutina em indivíduos jovens de *Gallus gallus* Linnaeus, 1758 infectados experimentalmente com *Plasmodium juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941 (Apicomplexa, Plasmodiidae)**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais, 67p.

CARDOSO, A.L.S.P. & TESSARI, E. N. C. 2003. Estudo dos parâmetros hematológicos em frangos de corte. **Arquivos do Instituto Biológico**, **70** (4): 419-424.

DHANAPALA, S.B. 1962. The occurrence of *Plasmodium juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941 in domestic fows in Ceylon. **Rev. Malar.** **41**:39-46.

ELISEI, C.O. 2001. **Criopreservação e caracterizações morfológica, morfométrica e ultra-estrutural de *Plasmodium (Novyella) juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941 (Apicomplexa: plasmodiidae)**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 64p.

ELISEI, C. O. 2005 **Morfologia, Morfometria, Biologia Molecular, Filogenia de *Plasmodium juxtannucleare* e uma nova proposta filogenética dos Gêneros *Plasmodium*, *Haemoproteus* e *Hepatocystis***. Tese de doutorado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.105p.

FERRAZ-FRANCO, H.; VAITSMÁN, J. & MOUTSSATCHÉ, I. 1954. Hemoparasitos em aves domésticas. Observações em matadouro do Distrito Federal. **Revista Militar de remonta e veterinária**, **10**: 154-158.

KRETLI, A.U. 1972. *Plasmodium juxtannucleare* in the state of Minas Gerais, Brazil. Studies on its prevalence and some aspects of its biology. **Revista do Instituto de Medicina Tropical se São Paulo**, **14**: 235-245.

MARGOLIS, L.; ESCH, G.W.; HOLMES, J.C. KURIS, A.M. & SCHAD, G. A. 1982. The use of ecological terms in parasitology (reports of an ad hoc committee of the American Society of Parasitologists) **J. Parasitol.** 68 (1): 131-133

MASSARD, C.L. & MASSARD, C.A. 1981. Aspectos biológicos do *Plasmodium (Novyella) juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941 em aves no Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, 4(3): 3-23.

MASSARD, C.L. 1982. Caracterização do Parasitismo por *Plasmodium juxtannucleare* (Haemosporidida: Plasmodiidae) em criações de *Gallus gallus* da raça Leghorn Branca. **Arquivos da Universidade Federal do Rural do Rio de Janeiro**, 5 : 141-146.

PARAENSE, W.L. 1949 Um inquérito sobre o ocorrência de *Plasmodium juxtannucleare* em Bambuí (estado de Minas Gerais). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 47 (3-4): 361-365.

SANTOS-PREZOTO, H.H.; D'AGOSTO, M. & DAEMON, E. 2004. Prevalência e variação dos estádios eritrocíticos do *Plasmodium (Novyella) juxtannucleare* em *Gallus gallus* sob condições naturais, no período de um ano. **Parasitologia Latino americana** 59: 14-20.

SILVEIRA,P. 2005. Efeito da cloroquina e rutina sobre *Plasmodium juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941 (Apicomplexa, Plasmodiidae) em galinhas imunossuprimidas da raça Leghorn branca. **Monografia de bacharelado**. Universidade Federal de Juiz de Fora. 32p.

SOARES, C.O.; MASSARD; C.L.: FONSECA, A.H. & SOUZA, P.C.A. 1999. Esquizogonia exoeritrocítica plasmática em *Plasmodium (Novyella) juxtannucleare* (Apicomplexa: Plasmodiidae). **Parasitologia al dia**, 23: 87-90

SOARES, C.O.; SOUZA, P.C.A. & MOTA, R.A. *et al.* 1999. Parasitismo de Leucócitos e trombócitos de *Gallus gallus* L. por *Plasmodium (Novyella) juxtannucleare* (Apicomplexa: Plasmodiidae). **Parasitologia al dia**, 23: 44-47.

SOUZA, P.C.A. 1998. **Malária aviária: Parasitismo por *Plasmodium (Novyella) juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941 em *Gallus gallus* L. de criações rústicas, nas mesorregiões do estado do Rio de Janeiro e aspectos clínicos e patológicos de sua infecção experimental.** Tese de doutorado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 137p.

VASHIST,U.; SILVEIRA,P.; D'AGOSTO, M. 2003. *Plasmodium (Novyella) juxtannucleare* em *Gallus gallus* no município de Juiz de Fora, MG **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, 13 (1): 244**

VASHIST, U. 2006. **Atividade malaricida da quercetina em aves *Gallus gallus* Linnaeus, 1758 da raça Leghorn Branca experimentalmente infectados por *Plasmodium juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941 (Apicomplexa, Plasmodiidae) e imunossuprimidos.** Monografia de conclusão de curso (Bacharelado em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Juiz de Fora. 27p.

VERSIANI, V. & GOMES, B.F. 1941. Sobre um novo hematozoário de galinha, *Plasmodium juxtannucleare* (nota prévia). **Revista Brasileira de Biologia, 1: 231-233.**

VERSIANI, V. & GOMES, B.F. 1943. *Plasmodium juxtannucleare*, parasita de galinha doméstica (notas adicionais). **Revista Brasileira de Biologia, 3: 113-117.**

3. Capítulo II

INFECCÃO EXPERIMENTAL DE *Plasmodium (Novyella) juxtannucleare* VERSIANI & GOMES, 1941 (HAEMOSPORIDA, PLASMODIIDAE) EM *Gallus* *gallus* L., 1758 (AVES, GALLIFORMES): AVALIAÇÃO DAS VIAS DE INOCULAÇÃO INTRAMUSCULAR E INTRAPERITONIAL

RESUMO

O agente causador da malária em *Gallus gallus* no Brasil é *Plasmodium juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941, que ocorre em alguns estados brasileiros. A manutenção da cepa deste parasito em laboratório, na grande maioria das vezes, é realizada *in vivo*, o que pode ser limitante quanto ao número possível de aves a serem inoculadas a partir de única ave doadora. Com o objetivo de otimizar o procedimento de inoculação experimental de *P. juxtannucleare* foram testadas as vias de inoculação intramuscular e intraperitonal, avaliando-se o número de parasitos encontrados em aves inoculadas com 0,5mL e 0,3mL de sangue parasitado. A partir de uma ave doadora, imunossuprimida, proveniente de zona rural do município de Juiz de Fora, MG, retirou-se sangue parasitado que foi inoculado em quatro grupos experimentais. Os grupos, com duas aves em cada, receberam sangue infectado, heparinizado, nas seguintes quantidade e vias, respectivamente: grupo 1 – 0,3mL , intraperitonal; grupo 2 - 0,3mL, intramuscular; grupo 3 - 0,5mL, intraperitonal; grupo 4 - 0,5mL, intramuscular. Durante 36 dias foram preparados esfregaços sangüíneos das aves para o acompanhamento do número de parasitos em cada grupo. Houve diferença significativa e diretamente proporcional entre as duas dosagens de sangue parasitado inoculado via intraperitonal, os indivíduos que receberam 0,5 mL demonstraram valores no número médio de parasitos superiores aos que foram infectados com 0,3mL. Na via intramuscular, o grupo que recebeu 0,5mL de sangue infectado, apresentou, na maior parte dos dias, médias do número de parasitos maiores que as do grupo que recebeu 0,3mL, entretanto os valores mais altos do número médio de parasitos esteve neste grupo. Em todas as vias de inoculação e doses, o período de pré-patência foi inferior a cinco dias e o pico máximo de parasitemia ocorreu ao 36º dia pós inoculação. Sugere-se não haver vantagens em se inocular 0,5mL ao invés de 0,3mL e que a infecção via intraperitonal eleva mais rapidamente a parasitemia em relação à infecção via intramuscular.

Palavras-chave: Vias de inoculação, doses de inóculo, malária aviária.

3.1. INTRODUÇÃO

Plasmodium juxtannucleare Versiani e Gomes, 1941 é o agente causador da malária em *Gallus gallus* que ocorre em diversos estados do Brasil. Esta espécie foi encontrada e descrita em galinhas de criações rústicas do estado de Minas Gerais (VERSIANI & GOMES, 1941) e, posteriormente, relatada em aves de criação comercial e silvestres (BENNET *et al.*, 1966; MOHAN & MANWELL, 1969; MASSARD, 1976 & SERRA-FREIRE & MASSARD, 1979).

A denominação *P. juxtannucleare* deve-se ao fato da freqüente justaposição dos estádios eritrocíticos em relação ao núcleo das células parasitadas. Outras características destes parasitos são as pequenas dimensões dos estádios sangüíneos e da alta especificidade para *G. gallus* (VERSIANI & GOMES, 1941; 1943).

VERSIANI & GOMES (1943) inocularam sangue infectado por *P. juxtannucleare* em aves jovens e observaram um período pré-patente de quatro a 15 dias para a via endovenosa e de seis a 20 dias para a via intramuscular. Em estudos comparativos realizados por KRETTLI (1971), em aves inoculadas com sangue parasitado aos sete dias de idade por via intramuscular foi observado um período pré-patente de 11 dias. Há relato de período de pré-patência, por inoculação intraperitoneal variando entre quatro a oito dias (MASSARD & MASSARD, 1981), e período de pré-patência em torno de 12 dias para esta mesma via a partir de amostras criopreservadas em glicerol (OLIVEIRA, 2001).

Uma vez que o modelo aviário pode ser uma alternativa viável para testes de substâncias anti-maláricas *in vivo* faz-se necessário uma constante busca pelo aprimoramento da metodologia empregada nestes modelos a começar pelo processo de inoculação experimental, a escolha da via de inoculação mais efetiva no desencadeamento da infecção, assim como o estabelecimento da quantidade mínima de inóculo a ser utilizada. Quando se realiza um experimento em que a cepa utilizada é mantida *in vivo*, depara-se com o problema da quantidade máxima de sangue que poderá ser retirado da ave doadora sem matá-la ou causar-lhe sérios danos, o que destaca a importância de se estabelecer a dosagem mínima eficaz quanto ao objetivo de estabelecer a infecção.

Este trabalho teve por objetivo testar vias de inoculação experimental, intramuscular e intraperitoneal da infecção por *P. juxtannucleare*, comparando-se o curso da infecção estabelecida em aves inoculadas com 0,5mL e 0,3mL de sangue parasitado.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

O sangue infectado foi obtido de uma galinha proveniente de criação rústica no Bairro Graminha, no município de Juiz de Fora, MG. A ave doadora foi levada para o Laboratório Avançado de Zoologia da Universidade Federal de Juiz de Fora. A ave foi imunossuprimida, por duas vezes no período de 46 dias, pela administração do acetato de metilprednisolona na dose de 26 mg/Kg de peso vivo. No dia das inoculações a ave doadora apresentava parasitemia em torno de 25% e peso corporal de 1,3 Kg. Foram retirados 3,2 mL de sangue e inoculados em oito indivíduos da raça Leghorn Branca, com 73 dias de idade, formando-se quatro grupos experimentais. Como os objetivos foram verificar a eficiência dos meios de inoculação e quantidade de sangue, à luz da bioética, utilizaram-se apenas dois animais por grupo experimental. Os grupos receberam sangue infectado, heparinizado, nas seguintes quantidade e vias, conforme o quadro 3 abaixo:

Quadro 3. Vias de inoculação e quantidade de sangue parasitado por *Plasmodium juxtannucleare* inoculado em quatro grupos experimentais formados por *Gallus gallus*.

Grupos experimentais	Quantidade de sangue inoculado (mL)	Via de inoculação
Grupo1 (2 aves)	0,3	Intraperitoneal
Grupo 2 (2 aves)	0,3	Intramuscular
Grupo 3 (2 aves)	0,5	Intraperitoneal
Grupo 4 (2 aves)	0,5	Intramuscular

O cálculo do número de hemácias parasitadas a ser inoculados nas aves, foi estimado pela hematimetria e a parasitemia da ave doadora (PARAENSE, 1947; KRETTLI, 1971). A hematimetria foi determinada, diluindo-se o sangue da galinha doadora na proporção de 1: 200 em solução a base de formaldeído 40%, citrato trisódio e água destilada. A contagem das hemácias foi feita em câmara de Neubauer (LIMA *et al.*, 1985). Considerando a parasitemia de 25% e a hematimetria de $2,5 \times 10^6$ hemácias por mL, o número de hemácias parasitadas inoculadas nos grupos 1 e 2 foi de aproximadamente $(0,18 \times 10^6)$ e nos grupos 3 e 4 de aproximadamente $(0,31 \times 10^6)$ hemácias parasitadas.

O número de parasitos de cada ave foi acompanhado pelo período de 36 dias pelo exame de esfregaços sangüíneos feitos nos quinto, sétimo e nono dia pós-inoculação e a partir do nono dia, a cada três dias. Os esfregaços foram fixados em metanol, corados por Giemsa, quantificando-se as formas do parasito encontradas no exame de 100 campos microscópicos por ave, com objetiva de imersão (1000x).

As aves foram acompanhadas quanto à presença de sinais clínicos decorrentes da infecção por esta amostra de *P. juxtannucleare*.

A análise das vias de inoculação e da quantidade de inóculo foi feita pela comparação do número de parasitos encontrados nos diferentes grupos experimentais. Foram gerados gráficos para visualização do número médio de parasitos ao longo do experimento nos diferentes grupos no programa Microsoft Excel for Windows.

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Infecção experimental

Independentemente da via de inoculação e da dose de sangue utilizada, todas as aves apresentaram-se infectadas por *P. juxtannucleare* no quinto dia após a inoculação.

3.3.2. Análise comparativa entre as doses inoculadas via intraperitoneal

Houve diferença na parasitemia das aves tratadas com as duas dosagens de sangue parasitado inoculado via intraperitoneal. Os indivíduos que receberam a dose de 0,5mL de sangue infectado via intraperitoneal exibiram, em sete dias, dos 12 observados, valores médios de parasitos maiores do que aqueles indivíduos que receberam inóculo de 0,3mL (Figura 5). Ao 36° dia pós-inoculação ocorreram as maiores médias de parasitos em ambos os grupos inoculados via intraperitoneal, sendo a maior média alcançada pelo grupo que recebeu o inóculo de 0,5mL de sangue infectado. Pode-se observar ainda, mais de um pico de parasitemia em ambos os grupos durante o período estudado (5°, 15° e 36° dia pós-inoculação).

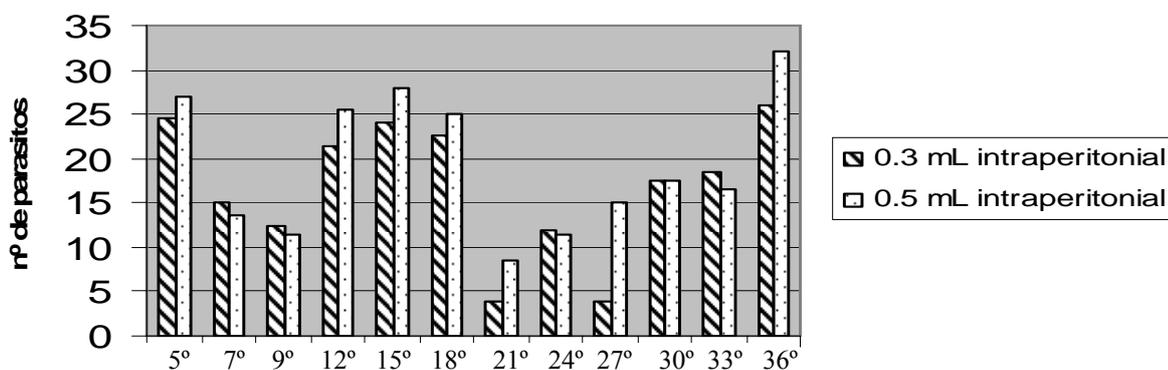


Figura 5. Média do número de parasitos em *Gallus gallus* inoculados por via intraperitoneal com sangue infectado por *Plasmodium juxtannucleare* nas dosagens de 0,3mL e 0,5mL.

3.3.3. Análise comparativa entre as doses inoculadas via intramuscular

O número de parasitos detectados nos indivíduos infectados pela via intramuscular nas dosagens de 0,3mL e 0,5mL variou ao longo de experimento (Figura 6). O grupo que recebeu 0,5mL de sangue infectado, apresentou, na maior parte dos

dias, médias do número de parasitos maiores que as do grupo que recebeu 0,3mL. Entretanto, o grupo que recebeu 0,3mL quando exibia médias superiores, apresentou os maiores valores registrados, mas no último dia do experimento o grupo inoculado com 0,5mL apresentou a maior média do número de parasitos de todo o experimento para a via intramuscular.

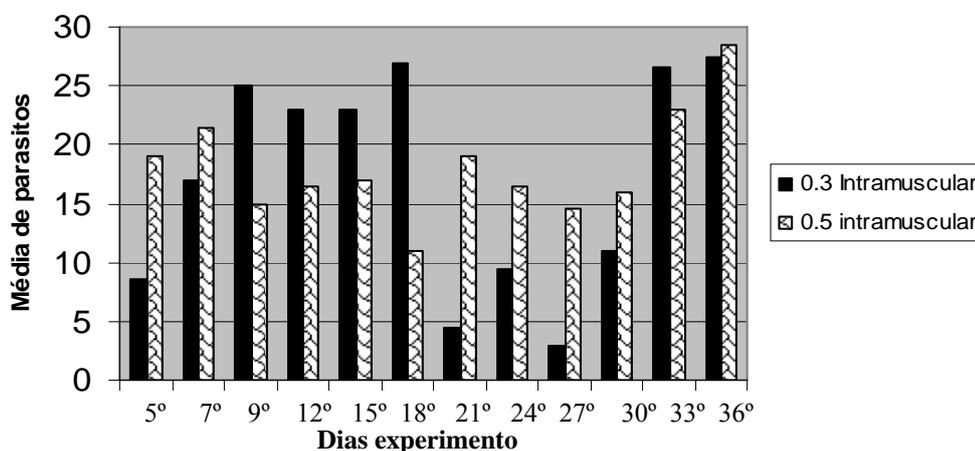


Figura 6. Média do número de parasitos em *Gallus gallus* inoculados por via intramuscular com sangue infectado por *Plasmodium juxtannucleare* nas dosagens de 0,3mL e 0,5 mL.

3.3.4. Análise comparativa entre as vias de inoculação intramuscular e intraperitoneal com 0,3mL de sangue infectado

Ao quinto dia após a inoculação com 0,3mL de sangue infectado foi registrado maior número médio de parasitos nos indivíduos inoculados pela via intraperitoneal e, nos dias subseqüentes este número decresceu, com tendência inversa comparado ao grupo inoculado pela via intramuscular (Figura 7). A partir do 12º dia de esfregaço houve variação do número médio de parasitos, entretanto a curva da infecção apresentou-se semelhante entre as duas vias. Os picos de parasitemia no grupo inoculado via intraperitoneal ocorreram nos 5º, 15º 36º dias pós-inoculação, enquanto

no inoculado via intramuscular, nos 9°, 18° e 36° dias.

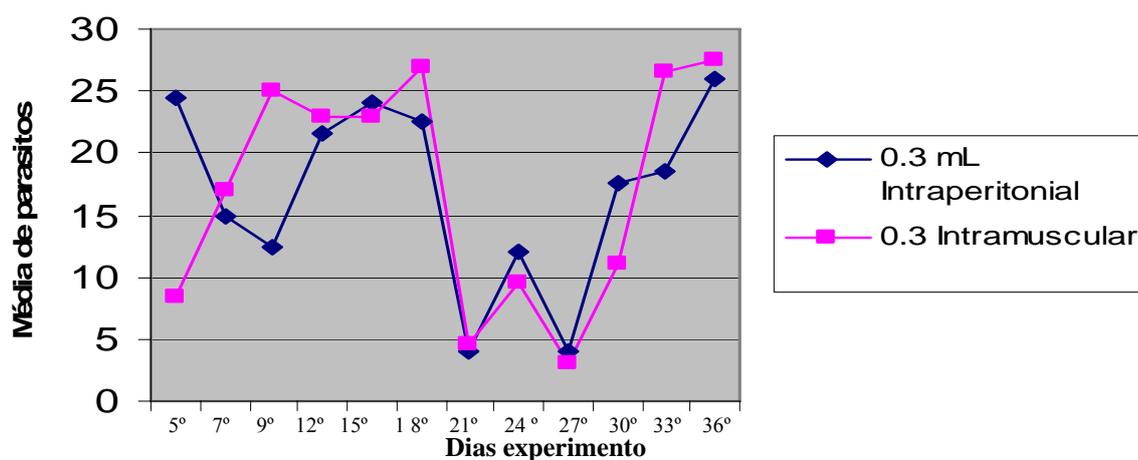


Figura 7. Média do número de parasitos em *Gallus gallus* inoculados por vias intraperitoneal e intramuscular com sangue infectado por *Plasmodium juxtannucleare* na dose de 0,3mL .

3.3.5. Análise Comparativa entre as vias de inoculação intramuscular e intraperitoneal com 0,5mL de sangue infectado.

Ao quinto dia após a inoculação com 0,5mL de sangue infectado, também foi registrado maior número médio de parasitos nos indivíduos inoculados pela via intraperitoneal e, nos dias subseqüentes este número decresceu (Figura 8). Em sete dias do experimento o grupo infectado por via intraperitoneal exibiu as maiores médias de parasitos em relação ao grupo que recebeu a mesma dose via intramuscular.

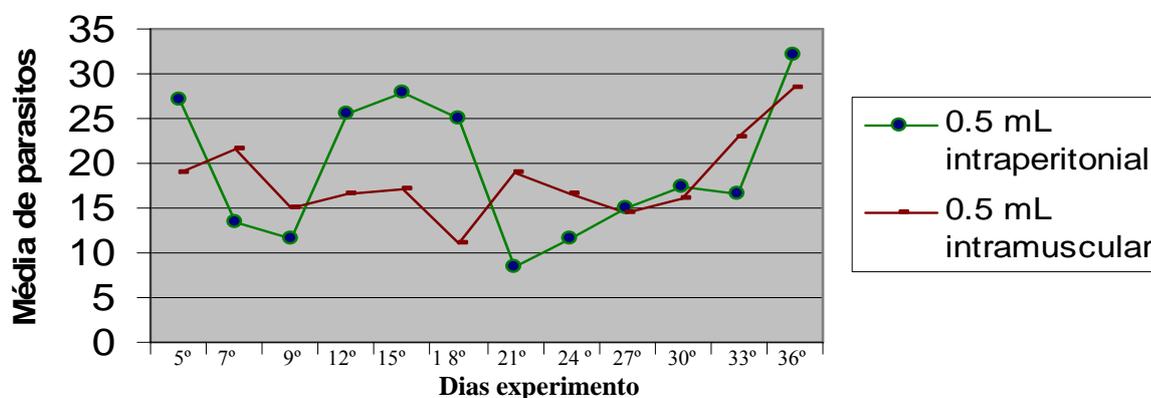


Figura 8. Média do número de parasitos em indivíduos inoculados por vias intraperitoneal e intramuscular com sangue infectado por *Plasmodium juxtannucleare* na dose de 0,5mL .

3.3.6. Período de Pré-Patência, Pico de Parasitemia e Número Médio de parasitos.

Em todas as vias de inoculação e doses, o período de pré-patência foi inferior a cinco dias e o pico máximo de parasitemia ocorreu ao 36º dia pós-inoculação, conforme demonstrado na Figura 9.

Quando comparados os quatro grupos (Figura 5), observa-se que o grupo 3 (0,5mL intraperitoneal) no 5º dia, já apresentava o maior valor médio de parasitos, seguido pelo grupo 1 (0,3mL intraperitoneal), tendo o grupo 2 (0,3mL intramuscular) o menor valor médio de parasitos neste dia. Ao 15º dia, o valor médio de parasitos dos grupos 1 e 2 praticamente se igualaram e ao 18º dia o grupo 2 exibiu a maior média de parasitos dentre os quatro grupos. No 36º dia, em ambas as doses, as médias dos grupos infectados por via intramuscular foram semelhantes, enquanto dentre os grupos infectados por via intraperitoneal, o que recebeu inóculo de 0,5mL apresentou média acima do grupo que recebeu 0,3mL. Todavia, assemelharam-se os valores médios de parasitos entre os quatro grupos no último dia (36º dia) deste estudo.

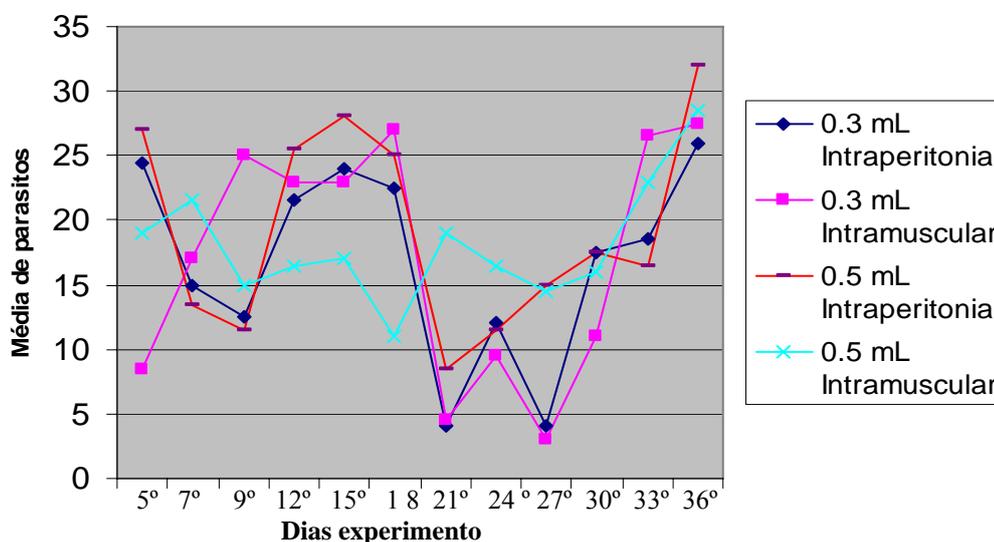


Figura 9. Média do número de parasitos em *Gallus gallus* inoculados por vias intraperitoneal e intramuscular com sangue infectado por *Plasmodium juxtannucleare* nas dosagens de 0,3mL e 0,5mL.

Observou-se que valores totais de parasitos contabilizados em cada grupo experimental ao fim do experimento foram semelhantes, conforme demonstrado na Figura 10.

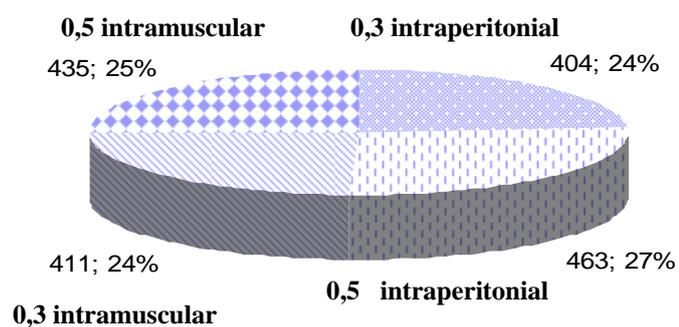


Figura 10. Número total e percentual de formas eritrocíticas de *Plasmodium juxtannucleare* em galinhas inoculadas pelas vias intraperitoneal e intramuscular com 0,3mL e 0,5mL de sangue, quantificados em 12 observações ao longo de 36 dias após a infecção.

3.3.7. Sinais Clínicos

As aves foram submetidas a exame clínico, realizado por um médico veterinário, e foi observado em todas as aves sinais de apatia e prostração, penas eriçadas, 3º pálpebra esbranquiçada e disfunção motora.

3.4. DISCUSSÃO

O estudo da biologia de *P. juxtannucleare* por meio de infecção experimental já foi realizado por vários autores (VERSIANI & GOMES, 1941, 1943; DHANAPALA, 1962; KRETLI, 1971; MASSARD & MASSARD, 1981; SOUZA, 1998; SOUZA, 2000, ELISEI 2001) que observaram períodos de pré-patência variando entre três e 18 dias, conforme a via de inoculação utilizada. No presente estudo, o período de pré-patência foi inferior a cinco dias para ambas as vias testadas. Em estudo feito por KRETLI (1971), em aves infectadas pela via intramuscular na dosagem de 0,5mL de sangue infectado, verificou-se período pré-patente de 11 dias. MASSARD (1976) encontrou período de pré-patência variando entre 4-8 dias para ambas as vias intraperitonal e intramuscular nas dosagens de 0,5mL e 1mL de sangue infectado. Este mesmo autor constatou que ao primeiro mês de inoculação a parasitemia eleva-se e decresce após o segundo mês, quando as aves entram em cronicidade e passam após 30 dias a apresentar raros parasitos na circulação periférica.

As diferenças entre os períodos de pré-patência observadas pelos autores, provavelmente ocorre devido à via de inoculação utilizada, ao grau de parasitemia do sangue inoculado, à virulência de cada cepa e à imunidade ou resistência dos animais inoculados (MASSARD, 1976). A cepa utilizada neste estudo demonstra ser virulenta quando se observam os sinais clínicos desta infecção. Provavelmente o curto período de pré-patência observado neste estudo pode ser atribuído à virulência elevada da cepa estudada.

Em estudos realizados por BENNET & WARREN (1966b) com infecção produzida a partir de inóculos sangüíneos de cepas malaias, foram registrados dois picos de parasitemias, aproximadamente, 25% e 30%, sendo que após o segundo pico a parasitemia decresceu. SOUZA (1998) estudando o isolado MSS-47, verificou apenas um pico parasitêmico sendo este aos 25 dias pós-inoculação intraperitonal na dose de 0,5mL de sangue infectado. No presente estudo foi possível verificar para os grupos inoculados via intraperitonal dois picos de parasitemia no período de 36 dias (15° e 36° dias); já para a via intramuscular, na dose de 0,3mL de sangue infectado, houve dois picos, aos 18° e 36° dias, enquanto que no grupo inoculado com 0,5mL de sangue, o número de parasitos passou a apresentar valores elevados a partir do 33° dia. Sugere-se acompanhar por maior período o curso desta infecção, para se confirmar a possível diminuição do número de parasitos após o segundo pico e a cronicidade da infecção.

Os resultados deste estudo sugerem que em relação ao número médio de parasitos, ao período de pré-patência e picos de parasitemia não há vantagem em se inocular 0,5mL de sangue infectado ao invés de apenas 0,3mL, que melhor viabiliza a obtenção de sangue de única ave doadora, logo da mesma cepa de parasito, em inoculações experimentais.

Quanto às vias de inoculação, a infecção estabelecida por via intraperitoneal exibiu picos de parasitemia mais elevados, o que corrobora os resultados de VERSIANI & GOMES (1941, 1943), KRETTLI (1971), MASSARD & MASSARD (1981) e ELISEI (2001). Entretanto, ao 36º dia as aves inoculadas por via intramuscular apresentaram valor médio de parasitos semelhante ao das aves inoculadas via intraperitoneal . Uma vez que a infecção intraperitoneal apresenta riscos de ocorrência de peritonites e mesmo da perfuração de órgãos abdominais, a infecção intramuscular torna-se uma opção mais segura em inoculação de indivíduos jovens e, portanto mais frágeis e de difícil manuseio. Entretanto, se o pesquisador desejar economia de tempo entre imunossupressão da ave doadora e inoculação experimental, os resultados deste trabalho sugerem a via intraperitoneal como a mais indicada.

3.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL DABAGH, M.A. 1961. Syntomatic partial paralysis in chicks with *Plasmodium juxtannucleare*. **Journal of comparative Pathology**, **71**: 217-221
- BENNET, F.G.; WARREN, M. & CHEONG, W.H. 1966. Biology of the Malaysian strain of *Plasmodium juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941. II. The sporogonic stages in *Culex (culex) sitiens* Wiedmann. **Journal of Parasitology**, **52**: 647-652
- DHANAPALA, S.B. 1962. The occurrence of *Plasmodium juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941 in domestic fows in Ceylon. **Revista de malariologia**, **41**: 39-46.
- ELISEI, C.O. 2001. **Criopreservação e caracterizações de *Plasmodium (Novyella) juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941 (Apicomplexa: Plasmodiidae)**. Tese de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro. 64p
- KRETLI, A.U. 1971. **Estudos sobre a prevalência, biologia e transmissão do *Plasmodium juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941**. Tese de mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, 73p.
- KRETLI, A.U. 1972. *Plasmodium juxtannucleare* in the state of Minas Gerais, Brazil. Studies on its prevalence and some aspects of its biology. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, **14**: 235-245.
- LEVINE, N.D. 1973. **Protozoan Parasites of Domestic Animals and Man**. 2ª edição. Ed. Burgess Publishing Co., Minneapolis, p. 270-274.
- LIMA, L.R.P.; T.T. OLIVEIRA, R. & NAGEM, T.J. 2003. Efeitos do flavonóide quercetina e dos corantes bixina e norbixina sobre os parâmetros sanguíneos em coelhos. **Revista de nutrição**, **16** (3): 305-314.

MASSARD, C.L. 1976. **Aspectos biológicos do *Plasmodium (Novyella) juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941 (Haemosporidida: Plasmodiidae) em aves no Brasil.** Tese de mestrado. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, Rio de Janeiro, 51p.

MASSARD, C.L. & MASSARD, C.A. 1981. Aspectos biológicos do *Plasmodium (Novyella) juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941 em aves no Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, 4(3): 3-23.

MASSARD, C.L. 1982. Caracterização do Parasitismo por *Plasmodium juxtannucleare* (Haemosporidida: Plasmodiidae) em criações de *Gallus gallus* da raça Leghorn Branca. **Arquivos da Universidade Federal do Rural do Rio de Janeiro**, 5 : 141-146.

MC GHEE, R.B.; WERNSDORFER, W.H. & GREGOR, M.C.I. 1988. Major animal models in malaria research. **Avian Malaria: Principles and Practice of Malariology**, 2: 1545-1567.

MOHAN, R.N. & MANWELL, R.D. 1969. *Plasmodium juxtannucleare* in African partridges (*Francolinus sp*). **Journal of Parasitology**, 55: 543.

MOTA, R.A. 1997. **Variáveis hematológicas em *Gallus gallus domesticus*, Linnaeus, 1758, de criações rústicas da região metropolitana do Recife, naturalmente infectadas com *Plasmodium juxtannucleare* (Versiani & Gomes, 1941).** Tese de doutorado, Universidade federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 58p.

MOTA, R.A.; CUNHA, E.L.P.; MODESTO, G.W.F.; SOARES, O.C.O. & MASSARD, C.L. 2000. *Plasmodium juxtannucleare* (Versiani & Gomes, 1941) em galinhas (*Gallus gallus* L. 1758) de criações rústicas no estado de Pernambuco. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, 7: (3) 178-190.

PARAENSE, W.L. 1949 Um inquérito sobre a ocorrência de *Plasmodium juxtannucleare* em Bambuí (estado de Minas Gerais). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 47 (3-4): 361-365

SERRA-FREIRE, N.M. & MASSARD, C.L. 1976. Ocorrência e Incidência de *Plasmodium juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941, em Belém- Pará. **Anais do Congresso da Sociedade Brasileira de Parasitologia**. Belém, Pará.

SERRA-FREIRE, N.M. & MASSARD, C.L. 1979. *Plasmodium juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941, parasito de *Gallus gallus* L. e *Crysolophus spp* na região do Pantanal do Estado do Mato Grosso do Sul. **Atas da Sociedade de Biologia do Rio de Janeiro**, **20**: 45-48.

SOUZA, P.C.A. 1998. **Malária aviária: Parasitismo por *Plasmodium (Novyella) juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941 em *Gallus gallus* L. de criações rústicas, nas mesorregiões do estado do Rio de Janeiro e aspectos clínicos e patológicos de sua infecção experimental**. Tese de doutorado, Federal Rural do Rio de Janeiro, 137p.

VERSIANI, V. & GOMES, B.F. 1941. Sobre um novo hematozoário de galinha, *Plasmodium juxtannucleare* (nota prévia). **Revista Brasileira de Biologia**, **1**: 231-233.

VERSIANI, V. & GOMES, B.F. 1943. *Plasmodium juxtannucleare*, parasita de galinha doméstica (notas adicionais). **Revista Brasileira de Biologia**, **3**: 113-117.

4. Capítulo III

**ATIVIDADE MALARICIDA DA 4-(6-MERCAPTOPURINA)-7-
CLOROQUINOLINA EM *Gallus gallus* LINNAEUS, 1758
EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS POR *Plasmodium (Novyella)*
juxtannucleare VERSIANI & GOMES, 1941 (APICOMPLEXA, PLASMODIIDAE)**

RESUMO

A malária aviária causa prejuízos em criações animais, especialmente em aves de criação rústica. Este tipo de criação ainda é a principal fonte de proteína de segmentos da população em todo o mundo. O objetivo deste trabalho foi testar o efeito de uma substância de uma série de análogos da cloroquina, a 4-(6-MERCAPTOPURINA)-7-CLOROQUINOLINA, derivada na posição 4 do grupo quinolina, sobre *P. juxtannucleare*. Quarenta e cinco aves foram inoculadas com sangue parasitado de uma galinha doadora que teve sua parasitemia exacerbada pela administração do acetato de metilprednisolona. Formaram-se quatro grupos experimentais com 15 aves cada grupo: Grupo 1 – aves não infectadas, Grupo 2 – aves infectadas e não tratadas, Grupo 3 – aves infectadas e tratadas com a cloroquina e Grupo 4 – aves infectadas e tratadas com a droga derivada da cloroquina. Em todos os grupos infectados o período de pré-patência foi inferior a dez dias e houve queda do número de parasitos encontrados nos últimos dias do experimento. Entretanto, o grupo tratado com o derivado da cloroquina apresentou as menores médias de parasitos ao longo do experimento. Não houve correlação entre parasitemia e temperatura e parasitemia e hematócrito. Nos grupos tratados com a cloroquina e o derivado houve retardo no pico máximo de parasitemia em relação ao grupo controle infectado. Este experimento sugere a eficácia da 4-(6-MERCAPTOPURINA)-7-CLOROQUINOLINA como malaricida.

Palavras-chave: Malaricida, cloroquina, galinhas.

4.1 INTRODUÇÃO

Muitas drogas têm estado disponíveis para o tratamento da malária humana, como derivados quinolínicos, sintetizados a partir da molécula de quinina, extraída da casca da árvore *Cinchona* sp. A cloroquina, utilizada como importante antimalárico, devido ao seu baixo custo, alta eficácia e pequena toxicidade, apresenta atividade restrita aos estágios eritrocíticos e não demonstra atividade contra todas as espécies do gênero *Plasmodium*, sendo o *Plasmodium falciparum* Welch, 1897 resistente a esta droga, não podendo, dessa forma, ser utilizada em áreas endêmicas desta espécie de plasmódio humano (KRETTLI *et al.*, 2001). A cloroquina atua inibindo a atividade da hemopolimerase no vacúolo alimentar do parasito, alterando a conversão do hemo (composto tóxico produzido durante a degradação da hemoglobina) em hemozoína ou pigmento malárico. Também exerce uma atividade secundária ao inibir a síntese de ácidos nucleicos e conseqüentemente a síntese protéica (SULLIVAN *et al.*, 1993).

A resistência de *P. falciparum* à cloroquina foi registrada pela primeira vez na Tailândia, em 1957, e logo a seguir, em 1961 na América do Sul, inclusive no Brasil. A resistência também ocorreu rapidamente com o uso de sulfamídicos associados a pirimetamina e mesmo com drogas mais recentes, como a mefloquina e o halofantrine (Figura 13), já foi registrada. Quanto ao quinino, vários trabalhos mostraram que *P. falciparum*, ainda que lentamente, vem apresentando níveis decrescentes de sensibilidade ao tratamento e as tentativas de induzir imunidade com vacinas ainda são experimentais (PINELLI *et al.* 1999)

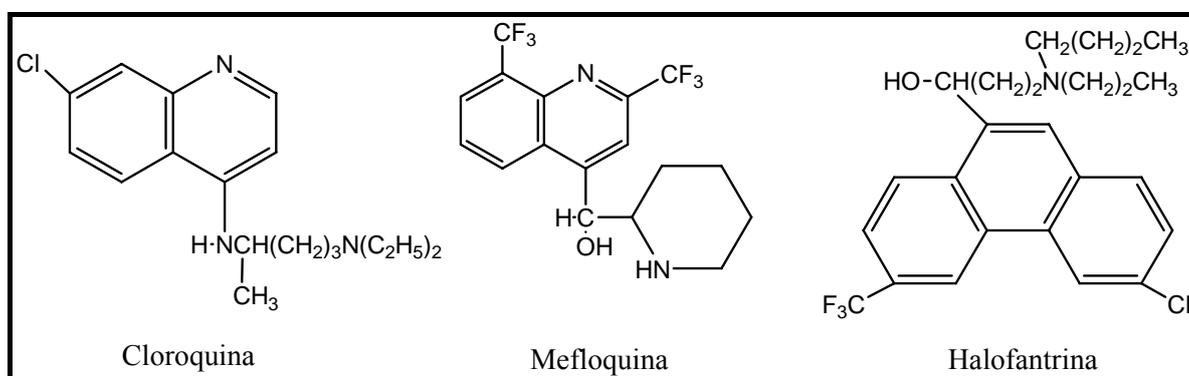


Figura 11: Estrutura química das principais drogas usadas no tratamento de *Plasmodium* spp.

Para administrar drogas, muitas vezes faz-se necessário o uso de substâncias veículo. O dimetilsulfóxido (DMSO) é uma substância freqüentemente utilizada em estudos biológicos como solvente de várias substâncias insolúveis em água (SANTOS *et al.*, 2003). O DMSO tem a propriedade de transportar substâncias através de membranas fisiológicas e quando misturadas ao DMSO, muitas drogas parecem ter seus efeitos fisiológicos potencializados (WOOD & WOOD, 1975).

A malária em galinhas causada por *P. juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941 é uma infecção que causa morbidade e mortalidade, sendo responsável por perdas econômicas em criações de aves de forma rústica. Pode causar quadro de anemia, febre, inapetência, congestão e megalia de órgãos, distúrbios digestivos e neurológicos e, nos casos de altas parasitemias, prostração e morte (DHANAPALA, 1962; KRETTLI, 1972; MASSARD & MASSARD, 1981; SOUZA, 1998 & SOARES *et al.* 1999). Em criações comerciais foi relacionada com a queda na produção de ovos (MASSARD, 1982). Na sua fase aguda a ave pode apresentar sintomas neurológicos decorrentes de lesões cerebrais e na medula espinhal, levando à falta de coordenação motora, fraqueza acentuada nas pernas, podendo, eventualmente, levar à paralisia. Também foram observados distúrbios sistêmicos como perda de apetite, emaciação (AL DABAGH, 1961), diarreia com fezes sanguinolentas, anemia evoluindo em casos mais severos para morte (SERRA-FREIRE & MASSARD, 1979).

A necessidade de se descobrirem novos alvos antiparasitários e novas terapias capazes de eliminar as doenças sem atingir o hospedeiro é de suma importância. O modelo das drogas requer a identificação de diferentes metabolismos entre o parasito e o hospedeiro.

O objetivo deste trabalho foi testar o efeito de uma substância de uma série de análogos da cloroquina, a 4-(6-MERCAPTOPURINA)-7-CLOROQUINOLINA (Figura 14), derivados na posição 4 do grupo quinolina sobre *P. juxtannucleare*.

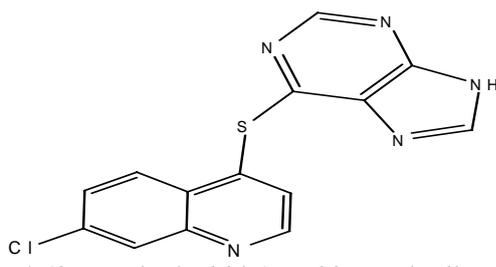


Figura 12. Estrutura química da 4-(6-MERCAPTOPURINA)-7-CLOROQUINOLINA.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. Síntese da 4-(6-MERCAPTOPURINA)-7-CLOROQUINOLINA.

A droga derivada da cloroquina testada neste experimento foi sintetizada pelo Prof. Dr. Adilson David da Silva (Departamento de Química da Universidade Federal de Juiz de Fora), a partir da 4,7-dicloroquinolína e a 6-mercaptopurina, produtos baratos e de fácil comercialização.

A figura 15 mostra a rota sintética para obtenção do análogo almejado.

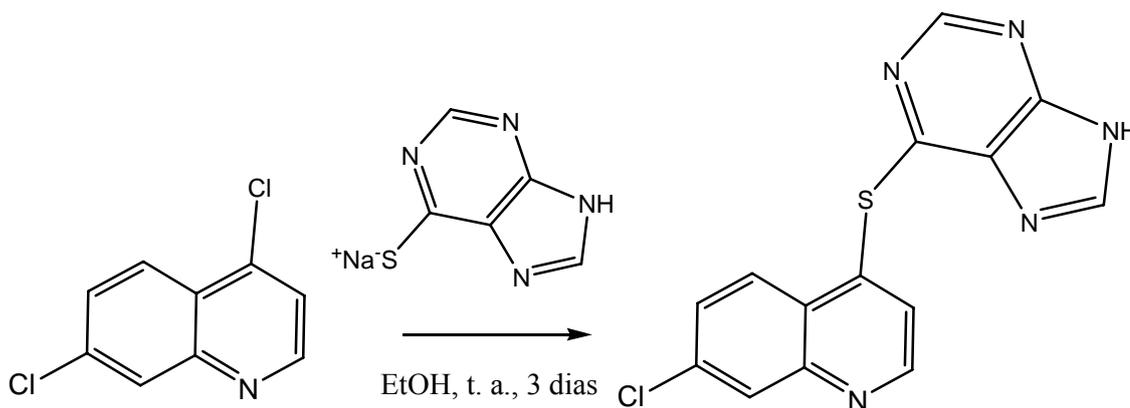


Figura 13. Rota sintética da 4-(6-MERCAPTOPURINA)-7-CLOROQUINOLINA

4.2.2. Teste Preliminar dos efeitos adversos do derivado da cloroquina sobre *Gallus gallus*.

Para a verificação de possíveis efeitos adversos do derivado da cloroquina foram utilizadas 10 aves da raça Leghorn Branca, adquiridas em casa comercial, aos 10 dias de idade, todas pesando 45g. Cinco aves serviram como grupo Controle e as outras receberam, via gavagem, utilizando-se sonda uretral nº 5 acoplada a uma seringa descartável de 5 mL, solução de água destilada, dimetilsulfóxido (DMSO) a 1% e o derivado da cloroquina na concentração de 2,2 mg/ mL. O grupo controle recebeu, via gavagem, apenas água destilada e DMSO a 1% para diluir o componente. As soluções foram administradas por quatro dias consecutivos, sempre no mesmo horário do dia (AMARAL, 2005), na dose diária de 100mg/Kg de peso vivo.

Por um período de 10 dias os indivíduos foram diariamente observados quanto a aparência das fezes, sinais de prostração ou hiperatividade. A cada cinco dias foram feitos exames de hematócrito e ao fim do experimento as aves foram pesadas.

4.2.3. Imunossupressão da ave.

Como doadora para a inoculação experimental foi escolhida uma galinha Leghorn Branca, criada de forma rústica, proveniente do Bairro Graminha, município de Juiz de Fora, MG, local com relato de 53% de prevalência (VASHIST *et al.* 2003).

No Laboratório de Microscopia do Programa de Pós- Graduação em Ciências Biológicas – Comportamento e Biologia Animal - da Universidade Federal de Juiz de Fora, a ave foi imunossuprimida, pela administração de acetato de metilprednisolona, no músculo peitoral, na dose de 26mg/Kg de peso vivo (SOUZA, 1998). Neste dia avaliou-se que a parasitemia estava em torno de 19%.

4.2.4. Preparo das aves para o teste da droga.

Foram obtidos, por doação das Granjas Planalto, município de Uberlândia, MG, 100 pintos da raça Leghorn Branca, machos e fêmeas, com um dia de idade e peso em torno de 15g. Todas as aves chegaram ao laboratório vacinadas contra Bouda aviária, doença de Gumboro e doença de Marek.

As aves foram mantidas em gaiolas teladas (tamanho: 78cm x 38cm x 58 cm) forradas por jornal e papel picado e iluminadas continuamente por lâmpadas incandescentes (Figura 16).



Figura 14. Condições das aves em laboratório

A alimentação fornecida nos primeiros 10 dias de vida foi à base de farelo de trigo, farinha de ostra, fubá grosso, canjiquinha e água. Três vezes na semana, recebiam verduras, legumes e vitaminas diluídas na água. Do décimo ao vigésimo dia de vida os pintos foram alimentados com ração comercial para crescimento, para ganharem peso para o experimento e serem tratados quanto a possíveis infecções prévias por antibiótico

presente na ração. Após o vigésimo dia, a dieta oferecida foi a mesma dos primeiros dez dias de vida, ou seja, ração manipulada, livre de coccidiostáticos. Foram examinados esfregaços sangüíneos das aves, corados por Giemsa e examinados em microscopia fotônica, para se confirmar que os indivíduos não estivessem previamente infectados por hemoparasitos.

4.2.5. Inoculação das aves e delineamento experimental.

Dez dias após a imunossupressão da galinha doadora, foram-lhe retirados 14 mL de sangue para as inoculações experimentais. Neste dia a parasitemia da ave doadora foi de, aproximadamente, 30% e a hematimetria em torno de $2,5 \times 10^6$ hemácias por mililitros.

Quarenta e cinco pintos da raça Leghorn Branca, aos 30 dias de idade, escolhidos aleatoriamente, foram inoculados com 0,3 mL de sangue da ave infectada, no músculo peitoral. Formaram-se quatro grupos, com os seguintes tratamentos (Quadro 4):

Quadro 4. Grupos experimentais e seus respectivos números de animais.

Grupo 1 (Controle não infectado)	15 aves
Grupo 2 (Controle infectado)	15 aves
Grupo 3 (Controle Cloroquina)	15 aves
Grupo 4 (Tratado com o Derivado da Cloroquina)	15 aves

As aves dos grupos 1 e 2 receberam apenas a solução veículo (água destilada com DMSO a 1%). As aves do grupo 3 receberam uma solução de água destilada, DMSO a 1% e cloroquina na dosagem de 100mg/Kg de peso vivo. Ao grupo 4 foi administrada uma solução de água destilada, DMSO a 1% e o derivado da cloroquina, na dose de 100mg/ Kg de peso vivo. Os tratamentos foram administrados por gavagem, por quatro dias consecutivos, iniciado um dia após a inoculação, sempre no mesmo horário (AMARAL, 2005).

Após o décimo dia da inoculação, a cada dois dias, durante 20 dias, esfregaços sangüíneos foram preparados, fixados em metanol, corados por Giemsa, e a parasitemia avaliada pela quantificação das formas do parasito encontradas no exame de 100 campos

microscópicos por ave, com objetiva de imersão (1000x). Foram aferidos o peso e a temperatura corporal das aves a cada dois dias e feitos hematócritos a cada quatro dias. As aves foram observadas durante todo o período do experimento quanto à presença de sinais clínicos da infecção.

4.2.6. Análise Estatística

Foram feitas análises de variância (ANOVA), com intervalo de confiança de 95%, Teste Kruskal-Wallis ou Teste t para a verificação de diferenças significativas no número de parasitos dentro de cada grupo ao longo do experimento. Para a comparação dos valores médios de parasitos entre os grupos experimentais foi utilizado o teste Man-Whitney. Para análises de correlação entre número de parasitos e temperatura e número de parasitos e hematócrito foi utilizado o Teste de correlação de Spearman. Todos os testes estatísticos e análise descritiva foram realizados no programa Biostat 2.0 e os gráficos gerados no programa Microsoft Excel.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1. Teste preliminar dos efeitos adversos do derivado da cloroquina sobre *Gallus gallus*.

Durante os dez dias de acompanhamento das aves após a administração do derivado de cloroquina, não foi possível perceber nenhum indicativo de reações adversas causadas por este composto. As fezes exibiram aparência normal, o comportamento das aves em laboratório não se modificou. As aves foram examinadas por um médico veterinário que confirmou que elas se encontravam em bom estado clínico.

4.3.2. Inoculação das aves.

Pelo exame dos esfregaços sangüíneos foi possível verificar que todas as aves inoculadas se infectaram com *P. juxtannucleare*.

4.3.3. Estádios eritrocíticos.

Foram encontrados nos esfregaços sangüíneos das aves trofozoítos, esquizontes e gametócitos (Figura 17), sendo em todos os grupos o trofozoíto o estágio predominante, como também observado em outros trabalhos em aves experimentalmente infectadas (ELISEI *et al.*, 2001; SILVEIRA, 2005; AMARAL, 2005; VASHIST, 2006)

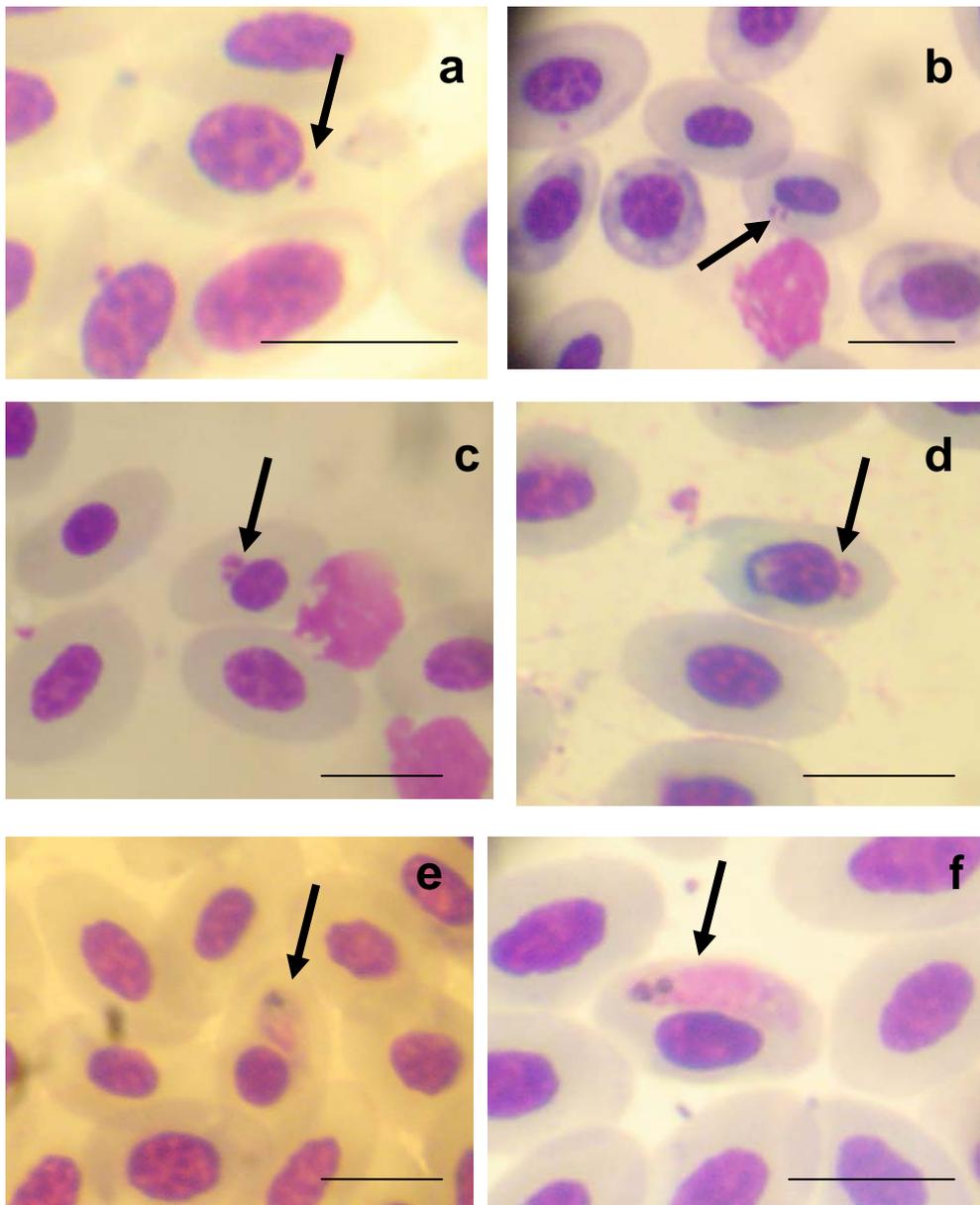


Figura 15. Estádios eritrocíticos de *Plasmodium juxtannucleare* encontrados em *Gallus gallus* infectados experimentalmente. a, b –trofozoítos; c,d – esquizontes; e,f – gametócitos. (____ = 10 μ m)

4.3.4. Pico máximo de parasitemia, número de parasitos e período pré-patente

O pico máximo de parasitemia no grupo 2 (infectado e sem tratamento) foi constatado ao 10^o dia pós-inoculação, quando se iniciou o exame dos esfregaços, e no 16^o dia para os grupos 3 (infectado e tratado com a cloroquina) e 4 (infectado e tratado com o derivado cloroquina) (Figura 17). Em todos os grupos experimentais o número médio de parasitos encontrados se manteve baixo (inferior a 25 parasitos em 100 campos analisados ao microscópio por ave). As maiores médias do número de parasitos foram registradas no grupo 2, enquanto que as menores, no grupo 4. Ressalta-se que, além do retardo do pico de parasitemia observado nos grupos 3 e 4 em relação ao grupo

2, os valores de pico no número de parasitos para os grupos 3 e 4 não chegaram a 50% do valor registrado no grupo 2. Entretanto, ao final do experimento os três grupos exibiram números médios de parasitos contabilizados semelhantes.

Quando comparados estatisticamente os valores médios de parasitos encontrados nos três grupos entre si, foram constatadas diferenças significativas nos 10° ($p= 0,002$), 24° ($p= 0,002$), 26° ($p=0,03$) e 28° ($p\approx 0,05$) dias pós-inoculação. Ao 10° dia, houve diferença significativa entre os grupos 2 e 3 e entre 2 e 4, o que não ocorreu entre os grupos 3 e 4, ou seja, o grupo controle infectado teve número de parasitos significativamente maior que os grupos tratados, não diferindo entre os grupos tratados com cloroquina e derivado. No 24° dia, houve diferença significativa entre os grupos 2 e 4 e entre 3 e 4, não havendo diferença estatística entre os grupos 2 e 3, ou seja, o número de parasitos no grupo tratado com derivado cloroquina foi significativamente inferior aos dos grupos controle infectado e tratado com cloroquina. No 26°, os resultados foram semelhantes aos do 10° dia, com diferença significativa entre os grupos 2 e 3 e entre 2 e 4, sem diferença entre 3 e 4. Ao 28° dia, o número de parasitos encontrados no grupo 4 foi significativamente menor em relação aos grupos 2 e 3.

O número total de parasitos encontrados em cada grupo pode ser visualizado na Figura 18. Em relação ao grupo 2, o grupo 3 exibiu o valor médio de parasitos encontrados 34% inferior e o grupo 4 teve média 40% inferior. Quando comparados os grupos 3 e 4, observou-se que o grupo 4 teve valor médio de parasitos 21% inferior ao grupo 3. O que sugere maior eficácia malaricida do derivado comparado à cloroquina.

AMARAL (2005) testou em infecções causadas por *P. juxtannucleare* em *Gallus gallus* três substâncias, a cloroquina e os flavonóides quercetina e rutina. Das três substâncias testadas apenas a cloroquina apresentou atividade malaricida importante sobre este parasito. Neste trabalho também foi verificada a ação malaricida da cloroquina e ressalta-se que o derivado da cloroquina manteve o número médio de parasitos inferior ao grupo tratado com a cloroquina.

Em todos os grupos o período de pré-patência foi inferior a 10 dias. Há na literatura períodos de pré-patência entre 4 e 20 dias (VERSIANI & GOMES, 1943; KRETTLI, 1971; MASSARD & MASSARD, 1981; ELISEI, 2001, 2005). Segundo MASSARD (1976) o período de pré-patência pode estar relacionado à virulência de cada cepa e à imunidade ou resistência dos animais inoculados.

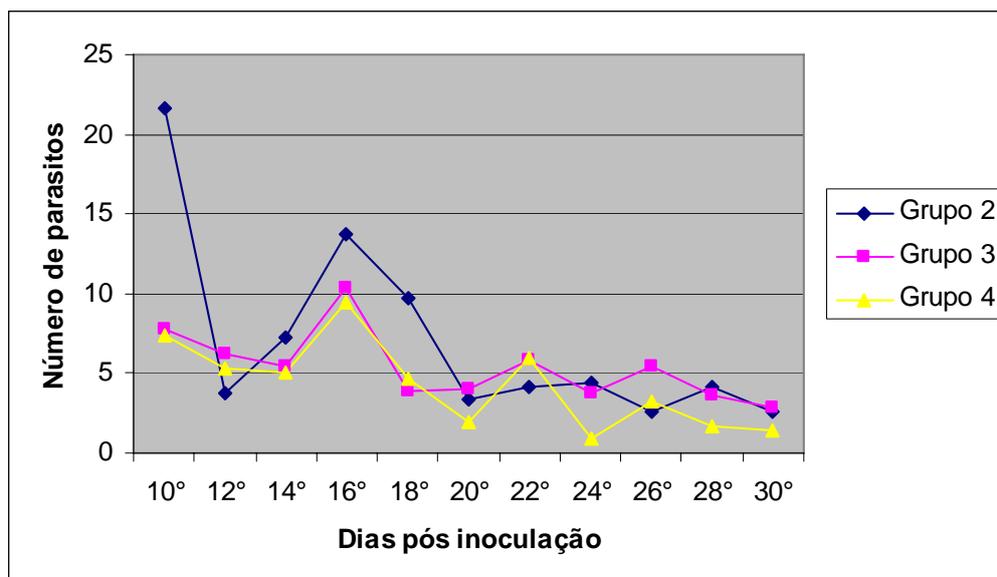


Figura 16. Número médio de formas eritrocíticas em grupos de aves inoculadas experimentalmente com *Plasmodium juxtanucleare*. (Grupo 2 – infectadas e não tratadas, Grupo 3 – infectadas e tratadas com a cloroquina, Grupo 4 – infectadas e tratadas com o derivado da cloroquina).

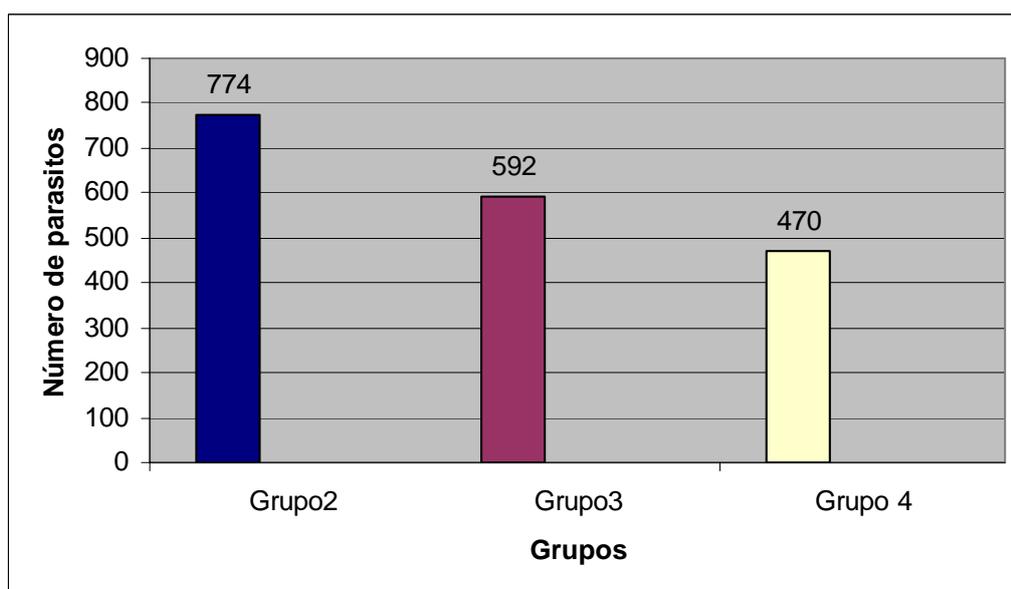


Figura 17. Valores totais de parasitos encontrados em cada grupo do 10° ao 30° dia do experimento. (Grupo 2 – infectadas e não tratadas, Grupo 3 – infectadas e tratadas com a cloroquina, Grupo 4 – infectadas e tratadas com o derivado da cloroquina).

4.3.5. Curva de Temperatura corporal e Correlação com a Parasitemia.

A temperatura corporal das aves oscilou entre os valores médios de 39,7°C e 41,3°C, como visualizado na Figura 20. Todas as temperaturas registradas estiveram dentro do valor médio considerado normal para esta espécie que segundo STURKIE (1968) *apud* SOUZA (1998) é igual ou inferior a 41,9° C. A não-reação febril também

foi observada por VERSIANI & GOMES (1943), AMARAL (2005), SILVEIRA (2005), VASHIST (2006).

Quando realizado o teste de correlação entre temperatura corporal e parasitemia foi possível verificar somente no 22º dia pós-inoculação no grupo 2 correlação positiva e diretamente proporcional ($p= 0,01$; Coef. Spearman = 0,7406) entre a temperatura e parasitemia. Para os demais grupos em nenhum dia foi verificada esta correlação.

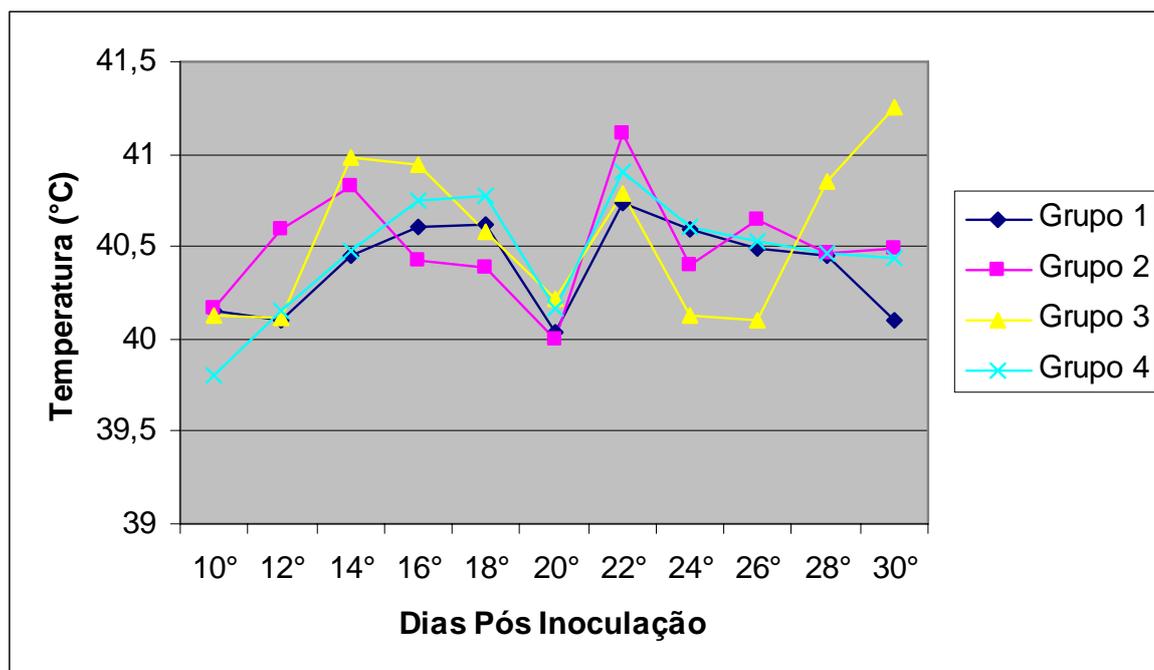


Figura 18. Médias de temperatura corporal das aves dos grupos estudados ao longo do experimento. (Grupo 1 – Controle não infectado, Grupo 2 – infectadas e não tratadas, Grupo 3 – infectadas e tratadas com a cloroquina, Grupo 4 – infectadas e tratadas com o derivado da cloroquina.)

4.3.6. Curva de hematócrito e Correlação com a Parasitemia.

As aves de todos os grupos exibiram valores percentuais de hematócrito consideravelmente acima do valor de referência de 26,9% para galinhas (SOUZA, 1998), como visualizado na Figura 21.

Não foi verificada nenhuma correlação entre parasitemia e hematócrito nos três grupos estudados, tal como os resultados do capítulo 1.

Os altos valores de hematócrito nas aves podem estar relacionados a um possível quadro de desidratação destas .

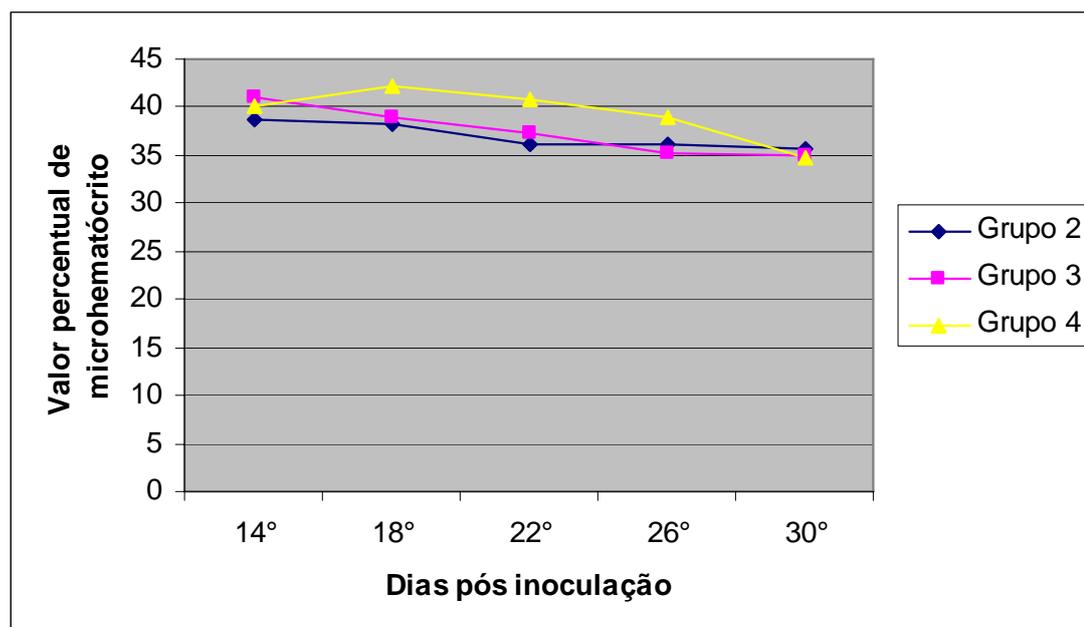


Figura 19. Valores percentuais de hematócrito nas aves ao longo do experimento. (Grupo 2 – infectadas e não tratadas, Grupo 3 – infectadas e tratadas com a cloroquina, Grupo 4 – infectadas e tratadas com o derivado da cloroquina).

4.3.7. Estado clínico das aves no curso da infecção.

Foram verificados sinais como apatia, prostração e palidez nas maioria das aves dos grupos infectados durante o experimento. Estes sinais já foram observados por outros autores (DHANAPALA, 1962; KRETTLI, 1972; MASSARD & MASSARD, 1981; SOUZA, 1998 & SOARES *et al.* 1999)

No segundo dia consecutivo de gavagem, foi verificada diarreia acentuada com sangue no grupo 3 e diarreia branda no grupo 4. No terceiro e no quarto dia de gavagem verificou-se diarreia nos grupos 1, 2, 3 e 4. Ressalta-se ainda que ao fim do experimento as aves completavam 60 dias de idade e todas com peso bem abaixo do esperado quando comparadas com aves Leghorn Branca tratadas de forma industrial.

Com base nos resultados obtidos foi possível constatar que o derivado da cloroquina testado 4-(6-MERCAPTOPURINA)-7-CLOROQUINOLINA apresentou atividade malaricida sobre *P. juxtannucleare* pois em relação aos grupos controles (sem tratamento e tratado com a cloroquina) o número médio de parasitos encontrados durante o experimento foi menor.

4.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL DABAGH, M.A. 1961. Syntomatic partial paralysis in chicks with *Plasmodium juxtannucleare*. **Journal of comparative Pathology**, **71**: 217-221

AMARAL, K. B. 2005. **Atividade anti-malárica da cloroquina e dos flavonóides quercetina e rutina em indivíduos jovens de *Gallus gallus* Linnaeus, 1758 infectados experimentalmente com *Plasmodium juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941 (Apicomplexa, Plasmodiidae)**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais, 67p

DHANAPALA, S.B. 1962. The occurrence of *Plasmodium juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941 in domestic fows in Ceylon. **Revista de malariologia**, **41**: 39-46.

ELISEI, C.O. 2001. **Criopreservação e caracterizações de *Plasmodium* (*Novyella*) *juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941 (Apicomplexa: Plasmodiidae)**. Tese de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro. 64p

ELISEI, C. O. 2005 **Morfologia, Morfometria, Biologia Molecular, Filogenia de *Plasmodium juxtannucleare* e uma nova proposta filogenética dos Gêneros *Plasmodium*, *Haemoproteus* e *Hepatocystis***. Tese de doutorado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.105p.

KRETLI, A.U. 1972. *Plasmodium juxtannucleare* in the state of Minas Gerais, Brazil. Studies on its prevalence and some aspects of its biology. **Revista do Instituto de Medicina Tropical se São Paulo**, **14**: 235-245.

KRETLI, A.U.; ANDRADE-NETO, V.F.; BRANDÃO, M.G.L. & FERRARI, W.M.S. 2001. The search for new antimalarial drugs from plants used to treat fever and Malaria or plants randomly selected: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **96** (8): 1033-1042.

MASSARD, C.L. & MASSARD, C.A. 1981. Aspectos biológicos do *Plasmodium (Novyella) juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941 em aves no Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, **4**(3): 3-23.

MASSARD, C.L. 1982. Caracterização do Parasitismo por *Plasmodium juxtannucleare* (Haemosporidida: Plasmodiidae) em criações de *Gallus gallus* da raça Leghorn Branca. **Arquivos da Universidade Federal do Rural do Rio de Janeiro**, **5** : 141-146.

MC GHEE, R.B.; WERNSDORFER, W.H. & GREGOR, M.C.I.. 1988. Major animal models in malaria research. **Avian Malaria: Principles and Practice of Malariology**, **2**: 1545-1567.

SANTOS, N.F.; FIGUEIRA- COELHO, J.; MARTINS-SILVA, J. & SALDANHA, C. 2003. Multidisciplinary utilization of dimethylsulfoxide: pharmacological, cellular and molecular aspects. **Biochemical Pharmacology**, **65** (7): 1035-1041.

SERRA-FREIRE, N.M. & MASSARD, C.L. 1979. *Plasmodium juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941, parasito de *Gallus gallus* L. e *Crysolophus spp* na região do Pantanal do Estado do Mato Grosso do Sul. **Atas da Sociedade de Biologia do Rio de Janeiro**, **20**: 45-48.

SOUZA, P.C.A. 1998. **Malária aviária: Parasitismo por *Plasmodium (Novyella) juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941 em *Gallus gallus* L. de criações rústicas, nas mesorregiões do estado do Rio de Janeiro e aspectos clínicos e patológicos de sua infecção experimental**. Tese de doutorado, Federal Rural do Rio de Janeiro, 137p.

SILVEIRA, P. 2005. Efeito da cloroquina e rutina sobre *Plasmodium juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941 (Apicomplexa, Plasmodiidae) em galinhas imunossuprimidas da raça Leghorn branca. **Monografia de bacharelado**. Universidade Federal de Juiz de Fora. 32p.

SOARES, C.O.; MASSARD, C.L.; FONSECA, A.H. & SOUZA, P.C.A. 1999. Esquizogonia exoeritrocítica plasmática em *Plasmodium (Novyella) juxtannucleare* (Apicomplexa: Plasmodiidae). **Parasitologia al dia**, **23**: 87-90

SULLIVAN, P.J.; GLUZMAN, I.Y.; RUSEL D.G.; GOLDBERG, D.E. 1993. On the molecular mechanism of chloroquine's antimalarial action. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, **93** : 11865-11870.

VERSIANI, V. & GOMES, B.F. 1943. *Plasmodium juxtannucleare*, parasita de galinha doméstica (notas adicionais). **Revista Brasileira de Biologia**, **3**: 113-117.

VASHIST,U.; SILVEIRA,P.; D'AGOSTO, M. 2003. *Plasmodium (Novyella) juxtannucleare* em *Gallus gallus* no município de Juiz de Fora, MG **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, **13 (1): 244**

WOOD, D.C. & J. WOOD. 1975. Pharmacologic and biochemical considerations of dimethylsulfoxide. **Annals of the New York Academy of Sciences**, **243**: 7-19.

5. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Nas condições estudadas, o parasitismo por *Plasmodium juxtannucleare* em aves experimentalmente infectadas com amostras obtidas de ave adulta procedente do bairro Graminha, Juiz de Fora, MG, ou imunossuprimidas por corticóide, não provoca alterações significativas entre os valores de peso, temperatura corporal e micro-hematócrito.

Em relação ao número médio de parasitos, período de pré-patência e picos de parasitemia não há vantagem em se inocular 0,5mL de sangue infectado ao invés de apenas 0,3mL, que melhor viabiliza a obtenção de sangue de única ave doadora em inoculações experimentais. Na inoculação via intraperitoneal o aumento da parasitemia ocorre mais rapidamente em relação à via intramuscular.

O derivado da cloroquina testado (4-(6-MERCAPTOPURINA)-7-CLOROQUINOLINA exerce atividade malaricida sobre *Plasmodium juxtannucleare*, apresentando maior eficiência na redução do número médio de parasitos comparada ao grupo controle não tratado e ao grupo controle tratado com cloroquina.

Sugere-se a investigação da ação malaricida desta substância em modelos com *Plasmodium berghei* ou culturas com *Plasmodium falciparum*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL DABAGH, M.A. 1961. Syntomatic partial paralysis in chicks with *Plasmodium juxtannucleare*. **Journal of comparative Pathology**, **71**: 217-221
- AMARAL, K. B. 2005. **Atividade anti-malárica da cloroquina e dos flavonóides quercetina e rutina em indivíduos jovens de *Gallus gallus* Linnaeus, 1758 infectados experimentalmente com *Plasmodium juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941 (Apicomplexa, Plasmodiidae)**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais, 67p
- BARRETO, M.P. 1943. Malária Aviária III. Sobre o encontro de formas exoeritrocíticas do *Plasmodium juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941 (Nota Prévia) **O Hospital**, **24**: 643-646.
- BELTRÁN, E. 1941. Hallazgo de *Plasmodium juxtannucleare* Versiani y Furtado em galinhas de Chiapas. **Rev. Inst. Salub. Enferm. Trop. Mex.****2**: 353-354.
- BENNET, F.G.; WARREN, M. & CHEONG, W.H. 1966. Biology of the Malaysian strain of *Plasmodium juxtannucleare* Versiane & Gomes, 1941. II. The sporogonic stages in *Culex (culex) sitiens* Wiedmann. **Journal of Parasitology**, **52**: 647-652
- BISHOP, A.; BIRKETT, B. & GILCHRIST, B.M. 1947. The response of blood inoculated and sporozoite-induced infections of *Plasmodium relictum* to drugs. **Parasitology**, **38**: 163-172.
- COX, F.E.G. 1994. The evolutionary expansion of the Sporozoa. **International Journal of Parasitology**, **24**: 1301-1316.
- DHANAPALA, S.B. 1962. The occurrence of *Plasmodium juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941 in domestic fows in Ceylon. **Revista de malariologia**, **41**: 39-46.
- ELISEI, C.O. 2001. **Criopreservação e caracterizações de *Plasmodium (Novyella) juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941 (Apicomplexa: Plasmodiidae)**. Tese de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro. 64p

FERRAZ-FRANCO, H.; VAITSMÁN, J. & MOUTSSATCHÉ, I. 1954. Hemoparasitos em aves domésticas. Observações em matadouro do Distrito Federal. **Revista Militar de remonta e veterinária**, **10**: 154-158

GARNHAM, P.C.C. 1966. Malaria Parasites and other Haemosporidia. **Blackwell Sci. Public.** Oxford, 1114p.

KRETLI, A.U. 1971. **Estudos sobre a prevalência, biologia e transmissão do *Plasmodium juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941.** Tese de mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, 73p.

KRETLI, A.U. 1972. *Plasmodium juxtannucleare* in the state of Minas Gerais, Brazil. Studies on its prevalence and some aspects of its biology. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, **14**: 235-245.

KRETLI, A.U.; ANDRADE-NETO, V.F.; BRANDÃO, M.G.L. & FERRARI, W.M.S. 2001. The search for new antimalarial drugs from plants used to treat fever and Malaria or plants randomly selected: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **96 (8)**: 1033-1042.

MASSARD, C.L. & MASSARD, C.A. 1981. Aspectos biológicos do *Plasmodium (Novyella) juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941 em aves no Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, **4(3)**: 3-23.

MASSARD, C.L. 1982. Caracterização do Parasitismo por *Plasmodium juxtannucleare* (Haemosporidida: Plasmodiidae) em criações de *Gallus gallus* da raça Leghorn Branca. **Arquivos da Universidade Federal do Rural do Rio de Janeiro**, **5** : 141-146.

MC GHEE, R.B.; WERNSDORFER, W.H. & GREGOR, M.C.I.. 1988. Major animal models in malaria research. **Avian Malaria: Principles and Practice of Malariology**, **2**: 1545-1567.

MOHAN, R.N.. & MANWELL, R.D. 1969. *Plasmodium juxtannucleare* in African partridges (*Francolinus sp*). **Journal of Parasitology**, **55**: 543.

MOTA, R.A.; CUNHA, E.L.P.; MODESTO, G.W.F.; SOARES, O.C.O. 7 MASSARD, C.L. 2000. *Plasmodium juxtannucleare* (Versiani & Gomes, 1941) em galinhas (*Gallus gallus* L. 1758) de criações rústicas no estado de Pernambuco. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, **7**: (3) 178-190.

PARAENSE, W.L. 1944. Infecção experimental do *Culex quinquefasciatus* pelo *Plasmodium juxtannucleare*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **41** (3): 535-540.

PARAENSE, W.L. 1947. Observações preliminares sobre o ciclo exoeritrocítico do *Plasmodium juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **45** (4): 813-822.

PARAENSE, W.L. 1949 Um inquérito sobre o ocorrência de *Plasmodium juxtannucleare* em Bambuí (estado de Minas Gerais). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **47** (3-4): 361-365

PIERCE, M.A.; BENNET, G.F. 1996. A revised key to the avian subgenera of *Plasmodium* Marchiafa & Celli, 1885 (Apicomplexa). *Systematic Parasitology*, **33**: 31-32. 1996

SANTOS-PREZOTO, H.H.; D'AGOSTO, M. & DAEMON, E. 2004. Prevalência e variação dos estádios eritrocíticos do *Plasmodium (Novyella) juxtannucleare* em *Gallus gallus* sob condições naturais, no período de um ano. **Parasitologia Latino americana** **59**: 14-20.

SERRA-FREIRE, N.M. & MASSARD, C.L. 1979. *Plasmodium juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941, parasito de *Gallus gallus* L. e *Crysolophus spp* na região do Pantanal do Estado do Mato Grosso do Sul. **Atas da Sociedade de Biologia do Rio de Janeiro**, **20**: 45-48.

SOUZA, P.C.A. 1998. **Malária aviária: Parasitismo por *Plasmodium (Novyella) juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941 em *Gallus gallus* L. de criações rústicas, nas mesorregiões do estado do Rio de Janeiro e aspectos clínicos e patológicos de sua infecção experimental.** Tese de doutorado, Federal Rural do Rio de Janeiro, 137p.

SOARES, C.O.; MASSARD; C.L.: FONSECA, A.H. & SOUZA, P.C.A. 1999. Esquizogonia exoeritrocítica plasmática em *Plasmodium (Novyella) juxtannucleare* (Apicomplexa: Plasmodiidae). **Parasitologia al dia**, **23**: 87-90

VASHIST,U.; SILVEIRA,P.; D'AGOSTO, M. 2003. *Plasmodium (Novyella) juxtannucleare* em *Gallus gallus* no município de Juiz de Fora, MG **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, **13 (1)**: 244

VERSIANI, V. & GOMES, B.F. 1941. Sobre um novo hematozoário de galinha, *Plasmodium juxtannucleare* (nota prévia). **Revista Brasileira de Biologia**, **1**: 231-233.

VERSIANI, V. & GOMES, B.F. 1943. *Plasmodium juxtannucleare*, parasita de galinha doméstica (notas adicionais). **Revista Brasileira de Biologia**, **3**: 113-117.

WENGELNIK,K.; VIDAL,V.; ANCELIN, M.L.; CATHIARD, A.M.; MORGAT,J.L.; KOCKEN,C.H.;CALAS,M.; HERRERA,S.;TOMAS, A.W. 7 VIAL, H.J.2002. Aclass of potent antimalarials and their specific accumulation in infected erythrocytes. **Science**, **295**: 1311-1314.