

Sensibilidade da Macaca mulatta ao bacilo de Stefansky, amostra do Instituto Pasteur de Paris, e estudo anátomo-patológico das lesões produzidas*

pelo

Dr. H. C. de Souza-Araujo

Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro

(com 5 ilustrações)

Com a colaboração anátomo-patológica
da Doutora RITA ALVES DE ALMEIDA CARDOSO

INTRODUÇÃO

Um rhesus (n.º 5 do Laboratório de Leprologia) fêmea de um ano de idade, procedente da criação da Ilha do Pinheiro, pertencente ao Instituto Oswaldo Cruz, foi por mim utilizado para experiências com quatro retroculturas das minhas amostras "Chaves I e Chaves II" (*Mycobacterium leprae hominis*), sendo duas de rhesus (do rhesus n.º 4, passagem do rhesus n.º 2, e do próprio rhesus 5) e duas de origem humana, a de n.º 16 de um doente de experiência da Colônia Mirueira (Recife) e de "Maria D.", espôsa do doente "Chaves", ambas recultivadas de material de biopsias de reações de MITSUDA, reacerbadas em consequência das inoculações daquelas culturas.

Em 11 meses (25-5-50 a 24-4-51) o símio foi inoculado 5 vêzes, apresentando sempre intensa reação, tanto local como geral, sintomas de bacilemia e formação de enormes granulomas. Tôdas essas 5 inoculações foram seguidas de biopsias para bacteriologia, histopatologia e passagens, e do necessário repouso. Das primeiras quatro inoculações foram obtidas retroculturas. Como o animal não se tivesse imunizado com as re-inoculações dessas culturas, resolvi utilizá-lo, após 5 meses de repouso, para experiências com o bacilo da lepra murina.

* Trabalho apresentado à III Conferência Pan-Americana de Leprologia. Buenos Aires, 9 a 15-XII-1951. Lido a 14-12-51.

INOCULUM

Como material infectante usei uma emulsão do leproma de um rato branco inoculado um ano antes (10-10-50) com a amostra do bacilo de STEFANSKY do Instituto Pasteur de Paris, gentilmente fornecida pelo Dr. R. CHAUSSINAND em setembro de 1947. Este rato foi sacrificado a 4-10-51 e imediatamente preparada a emulsão em sôro fisiológico do seu grande tumor subcutâneo ingüinal. Este rato tinha sido inoculado apenas com 0.5 cc. de emulsão idêntica, por via subcutânea, como aconselhava MARCHOUX. Este murídeo somente depois do 6.^o mês de incubação começou a mostrar empastamento na virilha direita, ponto da inoculação e com cêrca de um ano apresentava tumor subcutâneo ingüinal íntegro, não aderente à pele e tendo por centro um aglomerado de gânglios linfáticos. Não apresentava nenhuma placa de alopecia.

MARÇA DA INFECÇÃO

Considerando o tamanho do macaco, inoculei nêle uma dose da emulsão quatro vêzes maior (2 cc.) que a empregada, rotineiramente, para infetar ratos. Êsses dois c.c. foram injetados em 5 pontos: nas regiões malares (pele branca e glabra), na fronte, no peito e na virilha direita (pele peluda). Inoculado o animal na manhã de 4-10-51*, no dia seguinte fiquei surprêso por vê-lo bastante ativo e alimentando-se normalmente, coisa que nunca aconteceu quando era inoculado com as culturas de lepra humana.

48 horas após (6-10) o animal continuava em aparente saúde geral, apesar de se notar tumefação na face direita. No 4.^o dia (8-10) viam-se nódulos nas regiões malares, que, à palpação, senti serem duros e maiores do que grãos de milho. Na virilha direita sentia-se tumefação, e no peito não havia nada palpável. No 7.^o dia (11-10) os nódulos malares tinham o tamanho de azeitonas medianas. Ao apanhá-lo para fotografar feriu-se o nódulo da face direita, saindo pus sangüinolento, cujo exame microscópico revelou abudantes bacilos ácido-álcool-resistentes com os caracteres do de STEFANSKY, isolados, em feixes e massas. Nenhuma globia típica. Os instantâneos fotográficos das lesões da face não ficaram perfeitos, pois, tirados de lado não mostram a elevação dos tumores (v. fotos 1 e 2).

No 8.^o dia (12-10): 1.^a *Biopsia*. No 8.^o dia de incubação o animal apresentava — coisa excepcional em experiências com o bacilo de STEFANSKY — um nódulo em cada ponto das inoculações. O do peito, nódulo intracutâneo, de 2 × 1 cm, outro igualmente grande, subcutâneo, na virilha direita, parecendo, à palpação, tratar-se dum gânglio linfático muito hipertrofiado. Para bacteriologia e histopatologia biopsei o nódulo da face esquerda, que estava muito aderente à pele e tinha um abscesso central, cujo pus foi colhido com pipeta estirada e emulsionado.

* Todos os macacos inoculados com culturas de bacilos a.a.r. isolados de lesões leprosas mantenho em gaiolas individuais, numa sala do meu laboratório, de modo a poder inspecioná-los e alimentá-los duas vêzes ao dia.

Parte desta emulsão foi inoculada no sobrolho direito do próprio animal e o resto foi tratado pelo método de PETROFF e semeado em 3 tubos de meio de LOEWENSTEIN e um de caldo glicerinado, que não germinaram. O esfregaço da emulsão corado pelo ZIEHL-NEELSEN estava muito rico em bacilos a.a.r. Outro esfregaço corado pelo GRAM mostrou que êsses bacilos eram GRAM-positivos e não havia germes de contaminação. O tumor foi enviado à Divisão de Patologia para exame, cujo resultado foi o seguinte:

Histopatologia — P.C.17.469, 15-10-51 “Rheus n.º 5. Biopsia do tumor da face esquerda feita a 12-10. Animal inoculado em 4-10 com emulsão leprosa STEFANSKY de rato branco. Resultado do exame anátomo-patológico:

“Os preparados de pele mostram, no derma, granuloma constituído, principalmente, por grandes células mononucleares, de citoplasma abundante, muitas vezes vacuolados. Tais vacúolos encerram aglomerados de bacilos ácido-álcool-resistentes, os quais aparecem, também, esparsos, entre as células. Além das células acima descritas, o infiltrado inflamatório consta de raras células gigantes, linfócitos e numerosos leucócitos polimorfonucleares, formando êstes últimos grandes aglomerados, na porção mais profunda do derma. Epiderme sem alterações importantes.

Rio, 6 de novembro de 1951.

a) Dra. RITA ALVES DE ALMEIDA CARDOSO.”

No animal inoculado a 4-10 e biopsado a 12-10, isto é, no 8.º dia de incubação, a formação de granuloma com os caracteres acima descritos é um fato único na patologia da lepra murina experimental. O esfregaço do tumor corado pelo ZIEHL-NEELSEN revelou abundantes bacilos finos e recurvados, com finas granulações (STEFANSKY), alguns filamentos com 6 grânulos finos e mal corados, e dois campos com bacilos a.a.r. *trapus* (Infecção mista?). Vi também um piócito com uma linda globia do tipo novêlo.

A 17-10 o nódulo cutâneo do peito estava maior, protuberante, visto à distância, e sem queda de pelos da região.

No 21.º dia (25-10): 2.ª *Biopsia* — À apalpação sente-se um tumor do tamanho de um ovo de pomba, subcutâneo e íntegro, sem alopecia, na virilha direita. O tumor do peito foi biopsado, na presença do Dr. CANDIDO SILVA, do S.N.L., estava aderente à pele, por isso foi extirpado com grande fragmento desta; também estava penetrando no músculo grande peitoral; tinha o tamanho dum ovo de pomba e tinha abscesso central. Na mesma ocasião foi colhido pus da lesão da face direita. Os esfregaços do pus do tumor, do fragmento dêste e do pus da face se mostraram ricos em bacilos a.a.r. Essas três amostras de material foram tratadas pela soda e semadas em 18 tubos do meio de LOEWENSTEIN. Até esta data não houve germinação alguma. O esfregaço do tumor foi negativo à fluoromicroscopia, feita pelo Dr. LAERTE DE ANDRADE

Dois grandes fragmentos de tumor com pele foram enviados à Divisão de Patologia para exame, cujo resultado foi o seguinte:

Histopatologia — “Secção de Anatomia Patológica. N.º P.C.17.501. data: 25-10-51. Rhesus n.º 5 inoculado a 4-10 com emulsão de leproma de rato infetado com bacilo STEFANSKY. Biopsia de tumor do peito a 25-10-51 (21.º dia). Resultado do exame anátomo-patológico: “O aspecto dos cortes de pele é semelhante ao observado na biopsia anterior (P.C.17.469), notando-se, porém, nos preparados examinados neste momento, menor quantidade de bacilos ácido-álcool-resistentes.

Rio, 6 de novembro de 1951.

a) Dra. RITA ALVES DE ALMEIDA CARDOSO.”

No 25.º dia (29-10-51): 3.ª *Biopsia* — Após a cloroformização do animal extirpei-lhe, mediante uma larga incisão da pele, o tumor ingüinal que não estava aderente à pele e penetrava na musculatura da região. Na ferida coloquei quatro agrafes de MICHEL. O tumor de aspecto esponjoso (v. foto 3) idêntico ao do peito, era do tamanho dum ovo de pomba. Dividi-o em três partes, remetendo uma à Divisão de Patologia para exame, outra triturei e emulsionei juntamente com o pus colhido durante a operação, com ela semeando vários tubos de LOEWENSTEIN e inoculando 5 ratos e 5 camondongos brancos, que continuam em observação, e com a terceira parte preparei, pelo método de FUMIO HAYASHI, 20 c.c. de Lepromina para uso experimental. Os esfregaços do tumor revelaram regular quantidade de bacilos a.a.r. e GRAM-positivos, e negativos à fluoromicroscopia.

Histopatologia da 3.ª Biopsia: Seção de Anatomia Patológica do I.O.C. “N.º P.C.17.512. Data: 29-10-51. Rhesus n.º 5 inoculado há 25 dias com bacilo STEFANSKY. Fragmento de tumor subcutâneo da virilha direita. Resultado do exame anátomo-patológico: O material consta de um nódulo em cujo centro existem pequenas formações arredondadas, de tecido róseo-acinzentado, semelhantes a gânglios linfáticos. Essas formações são envolvidas por uma cápsula, à qual está aderente material friável, esbranquiçado. Os preparados microscópicos mostram, na porção central do nódulo, pequenos gânglios linfáticos, cujos seios linfáticos aparecem dilatados, cheios de grandes células mononucleares, de citoplasma abundante; em algumas zonas, tais células acham-se de permeio com grande número de células plasmáticas, linfócitos e leucócitos polimorfonucleares. Nesses gânglios, não foram encontrados bacilos ácido-álcool-resistentes. Na porção periférica do nódulo, os cortes mostram presença de granuloma constituído por células semelhantes às descritas acima, em alguns pontos encontrando-se grandes acúmulos de polimorfonucleares (abscessos). Nessas zonas vêm-se numerosos bacilos ácido-álcool-resistentes, vacuolados e granulados.

Rio, 23 de novembro de 1951.

a) Dra. RITA ALVES DE ALMEIDA CARDOSO.”

Após 25 dias de incubação, apenas, vemos aqui um tumor com todos os característicos do leproma de STEFANSKY.

Novembro 3 — Desde o 2.^o dia da operação o rhesus vem passando mal: tendo arrancado, logo que passou a ação do entorpecente, os agrafes, deixou a ferida exposta à contaminação do lixo da gaiola e das unhas. A ferida da virilha mede 5 cm de longo por 2 a 3 de largo, muito secretante e o animal a arranha e lambe freqüentemente.

Novembro 6 — Capturado o animal para exame encontramos a sua ferida ingüinal com abundante pus, cujo exame foi ++ para bacilos a.a.r. e GRAM +. Entupimos a ferida com penicilina em pó. A ferida do peito, onde foi extirpado grande pedaço de pele, está em franca cicatrização.

No 40.^o dia (14-11-51): 4.^a *Biopsia* — Nova captura do animal para exame e curativo: a ferida da virilha melhorou com a penicilina mas não está cicatrizando. Apresenta as bordas hipertróficas. No sobrolho direito onde, há 32 dias, foi re-inoculado com o próprio pus da face esquerda, está se formando uma pequena nodulação. Novos esfregaços de material colhido sob essa borda revelaram raros bacilos a.a.r. Fiz então uma biopsia dessa borda, do nódulo primário da frente e da face direita, cujo último esfregaço foi fortemente positivo para b.a.a.r.

Histopatologia da 4.^a Biopsia — Seção de Anatomia Patológica do I.O. Cruz. "N.^o do P.C.17.534, data: 14-11-51. Fragmento de pele da borda da ferida da biopsia feita a 29-10 no Rhesus n.^o 5. Resultado do exame anátomo-patológico: "Os preparados mostram cortes de pele onde se vê, no derma, infiltração celular, predominando os leucócitos polimorfonucleares; nota-se intensa proliferação de fibroblastos. Em certa porção profunda do derma encontra-se uma formação granulomatosa, constituída por grandes células mononucleares, de citoplasma abundante e por linfócitos, leucócitos polimorfonucleares e raras células gigantes. Não foram encontrados bacilos ácido-álcool-resistentes, nos cortes examinados.

Rio, 23 de novembro de 1951.

a) Dra. RITA ALVES DE ALMEIDA CARDOSO."

Outro relatório histopatológico da 4.^a biopsia:

"Seção de Anatomia Patológica do I. O. Cruz. N.^o P.C.17.535 de 14-11-51. Dois fragmentos de tumores da frente e da face direita do Rhesus n.^o 5, inoculado a 4-10-51 com bacilo STEFANSKY.

"Resultado do exame anátomo-patológico: os cortes de pele mostram presença, no derma, de intensa infiltração celular inflamatória. Em alguns pontos, vêem-se acúmulos de grandes células mononucleares, com abundante citoplasma (células epitelióides). Em outros pontos,

tais células mostram-se de permeio com linfócitos polimorfonucleares e algumas células gigantes, do tipo LANGHANS.

“Não foram encontrados bacilos ácido-álcool-resistentes nos cortes examinados.

Rio, 23 de novembro de 1951.

a) Dra. RITA ALVES DE ALMEIDA CARDOSO.”

No 50.º dia (24-11-51) — Novo exame rigoroso do animal: a ferida resultante da biopsia de 29-10 na virilha direita continua aberta, porém granulando no fundo. Após curetagem da sua borda, para exame microscópico, fiz nela o 3.º curativo com penicilina em pó. À apalpação nota-se um gânglio linfático hipertrofiado na virilha esquerda onde inoculei, a 29-10, o pus do próprio animal. Esfregaços de curetagem das narinas e das feridas do peito e da virilha foram negativos para bacilos a.a.r. Nas regiões malares e fronte existem lesões residuais dos nódulos biopsados; no corpo nenhuma placa de alopecia e o seu estado geral é bastante bom.

Bacteriologia — Até esta data (28-11-51) ainda não consegui a germinação de bacilos a.a.r. nos meios semeados com material das quatro biopsias.

Imunologia — A lepromina preparada com o tumor da 3.ª biopsia (20-10-51), intitulada “Lepromina Rhesus 5, Stef.” já foi inoculada concomitantemente com outras três diferentes (Amostra humana “Ney”, amostra “Stefansky” de gânglio de rato leproso e amostra “Rhesus 6” infetado com a retrocultura “Maria D., strain Chaves I”) em cerca de vinte pessoas, entre leprosos, suspeitos e comunicantes, com resultados cada vez mais interessantes. Este assunto será objeto de outro trabalho, quando estiver terminada a histopatologia das reações fortemente positivas.

CONCLUSÕES

1 — O A. verificou e descreveu, neste trabalho, a alta sensibilidade do Rhesus (*Macaca mulatta*) ao bacilo de STEFANSKY, amostra do Instituto Pasteur de Paris, inoculado por via subcutânea.

2 — Foi feita a histopatologia dos tumores cutâneos, subcutâneos e ganglionares de quatro biopsias realizadas do 8.º ao 40.º dias de incubação.

3 — Parte do tumor da terceira biopsia foi utilizada para fabrico de Lepromina do tipo HAYASHI cujo emprêgo em leprosos e comunicantes está dando resultados dignos de muita consideração.

4 — O A. inoculou material das lesões do rhesus em ratos e camundongos brancos, os quais continuam em observação.

5 — As sementeiras de material bacilífero do Rhesus em vários meios artificiais de cultura até agora não produziram germinação alguma.

6 — Após o necessário repouso o Rhesus será re-inoculado com a mesma amostra do bacilo de STEFANSKY a fim de tentar-se a passagem da infecção do Rhesus aos murídeos.

7 — Esta experiência merece ser repetida em maior escala.

Instituto Oswaldo Cruz, Rio, 28 de Novembro de 1951.

Dr. H. C. DE SOUZA-ARAÚJO

ADITAMENTO

Após 62 dias de repouso foi este Rhesus re-inoculado quando as primitivas lesões das suas biópsias estavam cicatrizadas (na frente, regiões malares e peito: cicatrizes perfeitas; na virilha direita restava uma estria ulcerada de 4 cm de longo).

Janeiro 14-1952: — Re-inoculado com 2 cc. de suspensão de leproma STEFANSKY nos sobrólhos, regiões malares e centro do peito. Quatro horas após o animal apresentava uma vermelhidão na frente e forte edema em toda a cara e permanecia em estado de sofrimento e profundo abatimento, recusando-se alimentar-se. Tudo isto em franco contraste com o ocorrido por ocasião da 1.^a inoculação a 4-10-51. No dia seguinte estava mais calmo. No 5.^o dia (19-1) apresentava nódulos tumorais na frente e faces, maiores no sobrolho esquerdo e região malar esquerda, onde afetava o tamanho duma azeitona comum.

No 12.^o dia (26-1) as lesões dos sobrólhos e face esquerda apresentavam-se cobertas de crostas e eritema na face direita e edema palpebral. No 14.^o dia (28-1) foi fotografado (Fotos 6 e 7) de frente e de perfil esquerdo, após retirada das crostas e colheita de pus das lesões para microscopia e bacteriologia. Esfregaço ++++. Todos os nódulos, como se vê nas fotografias, estavam ulcerados. O exame das suas fezes colhidas nesse dia foi + para b.a.a.r.

Janeiro 29. O pus colhido ontem foi tratado pela soda e semeado em 5 tubos de LOEWENSTEIN, 1 de DORSET e 1 de caldo glicerinado. Não houve nenhuma germinação, nem mesmo contaminação.

Janeiro 31 — Conjuntivite purulenta intensa do olho direito. O animal limpa-o, frequentemente, com o antebraço direito e lambe este, ingerindo o pus.

No dia 5 de Fevereiro (22.º dia) novos exames microscópicos do pus de duas lesões da face e das fezes: todos + para b.a.a.r., porém raros. A pesquisa pelo GRAM deu igual resultado.

No 36.º dia (19-2) foi sacrificado o animal mediante injeção de cloroformio nos pulmões, para exame anátomo-patológico. Depois do animal morto foi fotografado, vendo-se na foto 8 os 2 nódulos dos sobrolhos e os 2 das regiões malares ulcerados e uma ulceração triangular de 1,5 x 1 cm. no peito (foto 9) cercada por uma placa de alopecia. Os esfregaços de tumor e de gânglio foram fracamente positivos para b.a.a.r. e negativos os esfregaços dos órgãos (pulmão, fígado, baço, rim e vesícula).

Dos exames anátomo-patológicos forneceu-me a Dra. RITA CARDOSO os seguintes resultados:

P.C. 17.705, de 3-3-52. 2 fragmentos de pele e tumor do Rhesus 5.

Resultado do exame anátomo-patológico: "No derma, presença de infiltração por células epitelióides, células gigantes, macrófagos, linfócitos e leucócitos polimorfonucleares. Ocasionalmente, microabcessos. Ausência de bacilos ácido-álcool resistentes, nos cortes examinados."

P.C. 17.706, de 3-3-52. Gânglios subcutâneos do Rhesus 5.

Resultado do exame anátomo-patológico:

"Infiltração por células mononucleares, de citoplasma volumoso, mais numerosas na porção medular do gânglio. Ausência de bacilos ácido-álcool resistentes."

P.C. 17.707, de 3-3-52. Diversos órgãos do Rhesus 5.

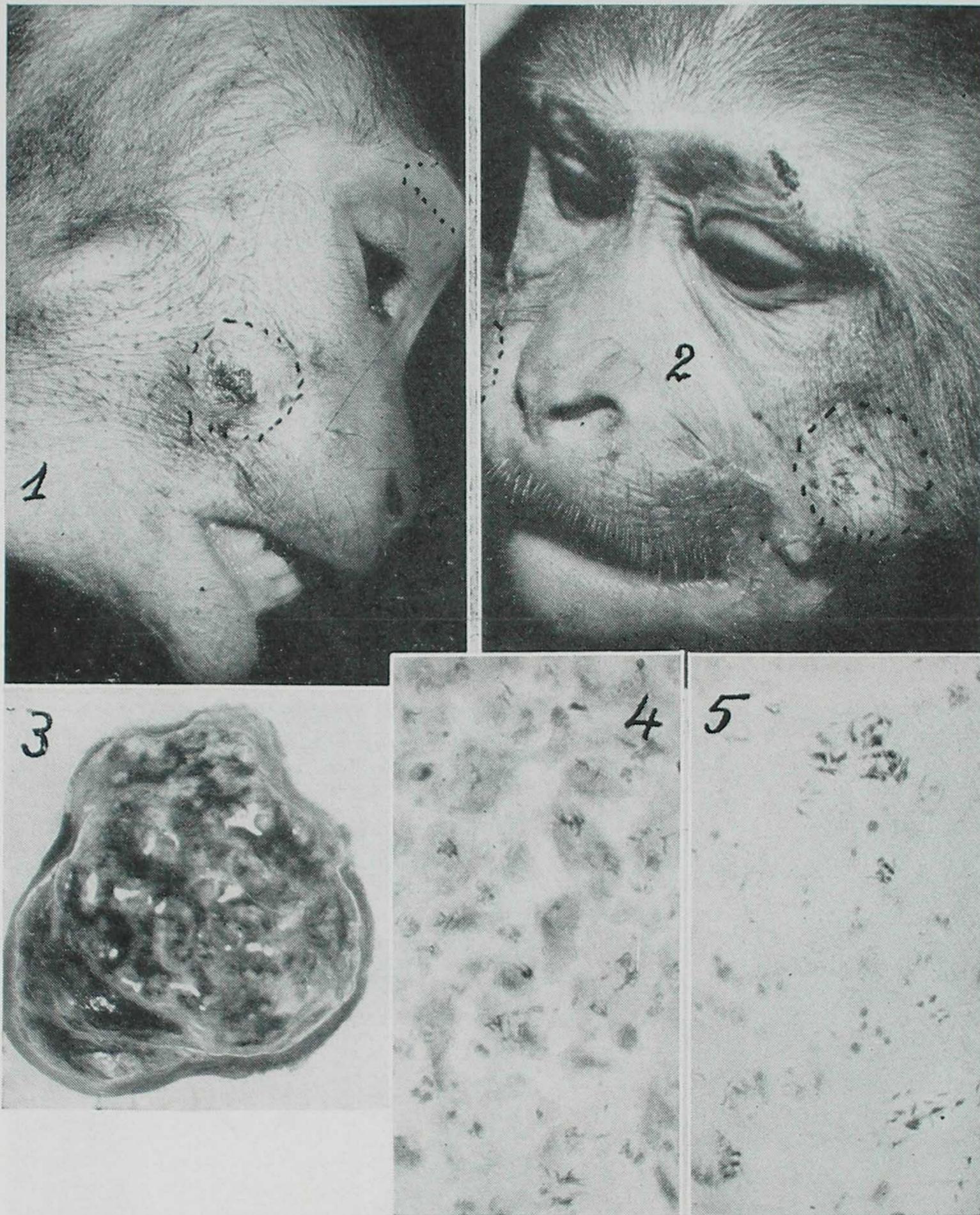
Resultado do exame anátomo-patológico: "*Fígado*: Focos de infiltração por células epitelióides, linfócitos, células plasmáticas. Alterações autolíticas. Ausência de bacilos ácido-álcool resistentes. *Rim*: Pronunciadas alterações autolíticas, assim como no *Pancreas*.

Pulmão: Edema. Hiperemia. Alterações autolíticas."

Os resultados dos exames microscópicos para a pesquisa de bacilos nas visceras e os anátomo-patológicos foram desconcertantes para mim, que esperava obter informes mais instrutivos.

Lesões cutâneas tão violentas em tão curto espaço de tempo sugerem a possibilidade duma infecção secundária virulenta, que não foi verificada ou passou despercebida.

Nenhuma conclusão posso tirar deste caso, realmente embaraçante para quem como eu que vem trabalhando, experimentalmente, há tantos anos, com o bacilo de STEFANSKY.



H. C. de Souza-Araujo: Sensibilidade da *Macaca mulatta* ao bacilo de Ste-fansky, amostra do Instituto Pasteur de Paris, e estudo anátomo-patológico das lesões produzidas.

Rhesus 5 (*Macaca mulatta*) (Figuras 1 e 2) inoculado com o bacilo de Ste-fansky a 4-10-51 e fotografado a 11-10 (7.^o dia de incubação), mostrando três tumores faciais.

Fig. 3 — Tumor extirpado a 29-10-51 (25.^o dia de incubação) da virilha direita do mesmo animal (3.^a biópsia).

Figs. 4 e 5 — Fotomicrografias de cortes do referido tumor, corados pelo método de Ziehl-Neelsen, mostrando abundantes bacilos a.a.r. intra e extracel-lulares, aumento de 800 v.



As fotografias 6 e 7 mostrando o edema facial e as lesões ulceradas nos sobrolhos e regiões malares do Rhesus 5, no 14.^o dia da reinoculação com o bacilo de STEFANSKY.

As fotogravuras 8 e 9 mostrando o estado das lesões da cara e peito do Rhesus 5, no 36.^o dia após a reinoculação com o bacilo de STEFANSKY. O animal tinha sido sacrificado mediante injeção de cloroformio nos pulmões meia hora antes.