

Desquisas sobre a Verruga peruana

pelos

DRS. ARISTIDES MARQUES DA CUNHA e JULIO MUNIZ

(Com as estampas 13-17.).

Tendo a secção de Protozoologia do Instituto Oswaldo Cruz recebido culturas de verruga e de febre de Oroya que a pedido do Dr. HENRIQUE DE BEAUREPAIRE ARAGÃO lhe haviam sido enviadas pelo Prof. NOGUCHI, resolvemos aproveitá-las para fazer algumas pesquisas sobre o assumpto.

O fim principal dessas pesquisas era verificar a significação e as relações existentes entre as inclusões descritas por MAYER, ROCHA LIMA e WERNER na verruga e a *Bartonella bacilliformis*.

Com a cultura de verruga no meio usado por NOGUCHI para as leptospi-
ras, cultura datando de 12 dias e que representava a terceira passagem feita em nosso laboratorio da amostra recebida, inoculámos um macaco (*Pseudocebus sp.*) com pequenas quantidades (0,1 a 0,2), por via intradérmica, em dois pontos da arcada superciliar direita e por via subcutânea, no quadril direito. Na arcada superciliar esquerda do mesmo animal, fizemos esscarificações pequenas

sobre os quaes depositámos um pouco da mesma cultura. No fim de 10 dias já se podiam observar nitidamente duas elevações na região da arcada superciliar direita, inoculada por via intradérmica.

Essas elevações foram se tornando cada dia mais accentuadas, chegando a formar dous nodulos, cujas superficies se apresentavam arroxeadas. Decorridos 16 dias após a inoculação, retirámos sangue da veia saphena e semeámos tubos com meio de NOGUCHI e com meio de NOELLER. Fizemos na mesma occasião o exame microscopico do sangue em laminas coradas pelo methodo de GIEMSA, sendo esse exame negativo para *Bartonella*. A temperatura do animal se manteve normal durante toda a observação, a não ser no terceiro dia após a inoculação, quando ella se elevou a 39° C. No 22° dia o animal foi sacrificado e autopsiado. N'esse momento além das lesões já referidas na arcada superciliar direita e que se podem observar nitidamente na photographia n° 1 que acompanha este

trabalho, apresentava o animal, no ponto inoculado por via subcutanea da região do quadril, um nódulo do tamanho de uma avelã e de coloração arroxeadada. Podia-se ver na arcada superciliar esquerda ao nível das escarificações, a formação de pequenos nódulos, com inicio de vascularização.

Foram feitas sementeiras em meio de NOGUCHI com material obtido por punção de um dos nódulos, bem como, com sangue do coração. As culturas feitas com material colhido das lesões, em meio de NOGUCHI para leptospira, mostravam no fim de 20 dias, uma turvação em forma de anel, que examinada ao microscopio, mostrou ser constituída pelo desenvolvimento de *Bartonella*. As culturas feitas com sangue, retirado durante a autopsia, bem como, com sangue retirado da veia, em vida do animal, foram negativas.

Os nódulos, assim como os ganglios das regiões correspondentes, foram retirados, cortados e collocados para fixar nos líquidos de ZENKER, REGAUD e sublimado alcool de SCHAUDINN. O mesmo foi feito com pedaços de todas as visceras. Todo esse material foi incluído em parafina para estudo anatomo-pathologico. Na mesma ocasião, fizemos grandes numero de esfregaços e preparados por impressão, com pedaços retirados dos diferentes nódulos.

Estudando essas laminas que foram após dessecamento fixadas pelo alcool e coradas pelo GIEMSA, encontramos ao lado de grande numero de hematias e de leucocytos polynucleares, cellulas volumosas, de fórmula arredondada ou fusiforme, dotadas as vezes de prolongamentos e que apresentam um nucleo de forma mais ou menos oval, corando-se em roxo escuro, cercado por uma massa de plasma de estructura quasi sempre alveolar e de coloração azul (Cellulas endotheliaes ?).

No interior de grande numero dessas cellulas, encontramos inclusões com as-

pecto de corpusculos, corando-se em vermelho arroxeadado, porém muito menos intensamente que o nucleo e dotadas de uma estructura nitidamente granulosa.

O seu numero em cada cellula é variavel bem como o seu tamanho, sendo que as menores fórmulas por nós encontradas, mediam de 1 micron a 1,5 micra de diametro. Em torno dessas inclusões, notamos que o plasma cellula muitas vezes se condensa, apresentando-se então, intensamente corado em azul. Quando no interior de uma d'essas cellulas existe um corpusculo unico, elle póde apresentar grandes dimensões, chegando muitas vezes a occupar todo o plasma e assumindo então o aspecto granuloso. Em muitas dessas fórmulas, podem-se observar na periphéria, elementos bacilliformes com nitida coloração bipolar, já destacados da massa que lhes deu origem. As vezes, ao lado das inclusões de maiores dimensões quando ellas não occupam todo o plasma da cellula, podem-se observar neste, elementos bacilliformes esparsos.

Quando as inclusões são em maior numero em uma mesma cellula, ellas não attingem as grandes dimensões observadas nas fórmulas anteriores, pois ellas como que se desagregam em elementos bacilliformes que se disseminam irregularmente pelo plasma, podendo invadil-o totalmente, sem comtudo apresentar o aspecto de uma massa compacta, observado nas fórmulas acima assignaladas.

Nesse caso, a cellula apresenta o plasma completamente cheio de corpusculos pequenos, alguns nitidamente bacilliformes, corados em roxo claro e que dão o aspecto de uma massa pontilhada.

Muitas vezes quando a invasão do plasma cellula por esses corpusculos não é completa, pode-se distinguir n'ella uma zona com a estructura e coloração normal, ao lado de outra profundamente alterada, na qual, se encontram corpusculos em grande numero. Tivemos ainda

ocasião de encontrar nos nossos preparados, pequenas massas, no interior das quaes podiam-se muitas vezes, distinguir elementos já em fôrma de halteres.

Essas massas em alguns casos, apresentavam-se cercadas de uma estreita zona de plasma corada em azul e com bordos irregulares. Ellas provavelmente se originam das fôrmas intracellulares postas em liberdade pela destruição da cellula e são ás vezes acompanhadas pela pequena porção de plasma mais denso que as cerca.

Convém assignalar aqui, que as hemalias encontradas em grande abundancia nos nossos esfregaços, não se apresentavam com bartonellas no interior. Estudando alguns córtes dos nodulos retirados do macaco, corados pela hematoxylina ferrica de HEIDENHAIN, encontrámos no interior das cellulas endotheliaes, pequenos bastonetes constituídos por 2 granulos intensamente corados e ligados por uma porção menos chromatica e mais fina.

A's vezes apresentavam as cellulas o protoplasma cheio dessas fôrmas.

Ellas correspondem ás fôrmas descritas no interior de cellulas endotheliaes por MACKENIE e WEISS em córtes de verruga experimental, obtida em macaco (*Cebus sp.*) inoculado com material humano.

As inclusões que descrevemos, são morphologicamente identicas ás que MAYER, ROCHA LIMA e WERNER assignalaram em casos de verruga humana.

Por outro lado ellas representam sem duvida alguma, fôrmas de multiplicação da *Bartonella*, conforme mostra claramente a verificação na periphéria dessas inclusões, de elementos bacilliformes com todos os caracteres desse parasita, que se destacam da massa central, que é provavelmente formada por um agglomerado de *Bartonellas*.

Evidentemente essas inclusões, são identicas as que STRONG e seus colla-

boradores observaram em um caso de febre de Oroya e que elles com razão interpretaram como fôrmas de multiplicação do parasita.

Queremos ainda accentuar que decorre de nossas pesquisas, que um germen perfeitamente cultivavel em meios em que não existem cellulas vivas, é capaz de dar logar a formação de inclusões semelhantes ás encontradas nas molestias produzidas por chlamydozoarios. Esse facto leva a crêr que pelo menos em alguns casos, as formações descritas como chlamydozoarios, são seres vivos e nesse caso elles devem corresponder morphologicamente aos *corpúsculos elementares* de PROWAZEK.

A multiplicação intensa desses elementos no interior da cellula, fôrma agglomerados que vão constituir por si sós ou juntamente com productos de reacção cellular, as inclusões bem conhecidas que caracterizam essas molestias.

As recentes pesquisas de NOGUCHI que conseguiu cultivar o agente do trachoma, vêm trazer novo e poderoso argumento em favor dessas ideias.

Outro ponto que visamos esclarecer em nossas pesquisas, se refere á therapeutica da doença.

Recentemente MAYER, WERNER e KIKUTH, verificaram o apparecimento de uma *Bartonella*, a *Bartonella muris*, no sangue dos ratos esplenectomizados. A presença desse parasita, acarreta nos ratos o apparecimento de uma grave anemia, terminando muitas vezes pela morte, que não deixa de ter analogias com a febre de Oroya.

Esses autores, aproveitaram esse parasita para estudos chimiotherapicos e aventam a hypothese de que os resultados obtidos com elle, sejam tambem applicaveis á *Bartonella bacilliformis*.

Tendo essas pesquisas demonstrado a acção energica exercida pelos arsenobenzoes sobre o parasita da qual resulta o desaparecimento desse e a cura do

animal, resolvemos experimentar a acção desse medicamento na verruga experimental.

Para isso inoculamos dous macacos na mesma data com cultura de verruga. Em ambos se desenvolveram nodulos de verruga nos pontos de inoculação, mas a doença não apresentou identica evolução nos dous animaes, e cerca de 20 dias após a inoculação, as verrugas mostravam em um, bom desenvolvimento, ao passo que em outro, pareciam em inicio de regressão.

Esse facto, é facilmente explicavel porque os animaes inoculados embora do mesmo genero (*Pseudocebus*), eram de especies differentes.

Apesar disso, injectamos um delles (o que apresentava lesões mais desenvolvidas) com 0,15 grs. de neo-salvarsan por via intravenosa. O animal veio a morrer 6 dias depois da injeccão sem que as lesões apresentassem o menor signal de regressão.

As experiencias nesse sentido estão ainda em via de execução, pelo que não podemos emittir opinião definitiva sobre o assumpto. Tudo, porém, nos leva a crêr, que os arsenobenzoës não exerçam sobre a *Bartonella bacilliformis*, acção identica á que foi observada pelos autores allemães na *Bartonella* do rato. Aliás os resultados que ARCE obteve em casos humanos de febre de Oroya, já faziam prevêr esse resultado.

ADDENDO.

Após a publicação do nosso trabalho sobre verruga peruana appareceram sobre o assumpto outras publicações que nos obrigam a fazer algumas considerações a respeito, bem como relatar as observações que fizemos posteriormente afim de elucidar alguns pontos considerados obscuros por alguns autores. Queremos nos referir aos trabalhos de

MEYER e KIKUTH sobre verruga peruana e de ROCHA LIMA sobre um caso de pseudo verruga proveniente do Amazonas.

MEYER e KIKUTH assignalam com razão que em seus primeiros trabalhos, NOGUCHI representa como fórmãs de *Bartonella* grupos de elementos bacilliformes encontrados nos nodulos de verruga obtidos no macaco pela inoculação de cultura.

Em preparados que lhes haviam sido enviados por NOGUCHI, MEYER e KIKUTH puderam verificar em uns, inclusões semelhantes as descriptas por MEYER, ROCHA LIMA e WERNER e em outros, os elementos bacilliformes representados por NOGUCHI em seus primeiros trabalhos sobre o assumpto. Esses elementos bacilliformes, segundo MEYER e KIKUTH, nunca foram encontrados nem em material humano de verruga nem em nodulos obtidos experimentalmente em macacos, partindo desse material.

ROCHA LIMA em outra publicação assignala o mesmo facto e o considera de difficil explicação.

NOGUCHI, em trabalho posterior publicado em Março de 1927 e do qual só tivemos conhecimento tempos depois da publicação das nossas pesquisas sobre o assumpto, na Sociedade Brasileira de Biologia, assignala fórmãs de *Bartonella* no interior de cellulas endotheliaes, admittindo a possibilidade de representarem ellas, quando indistinctamente coradas, as inclusões descriptas por MEYER, ROCHA LIMA e WERNER.

Convém assignalar aqui que NOGUCHI nesse trabalho não se refere mais aos grupos de bacillos por elle descriptos nas primeiras publicações, dizendo claramente: «None except endothelial cells contain *Bartonella bacilliformis* in the cytoplasm, and no extracellular localization of the parasites can be detected».

No nosso trabalho acima citado (*Comptes rendus des séances de la Société de Biologie, tome XCVII, page 1368*) assignalámos na verruga oblida experimentalmente por meio da inoculação de cultura de *Bartonella* em macacos, a existencia de inclusões que identificámos ás descriptas por MEYER, ROCHA LIMA e WERNER e que foram interpretadas por nós como fórmulas de multiplicação da *Bartonella*.

Nessas nossas pesquisas, que foram feitas em esfregaços corados pelo GIEMSA e em cortes corados pelo processo de HEIDENHAIN não tivemos occasião de encontrar os grupos de bacillos assignalados por NOGUCHI e identificados por elle, nas primeiras publicações, á *Bartonella*.

Em vista das duvidas que exprimiram MEYER KIKUTH e ROCHA LIMA resolvemos examinar novamente o material que serviu para os nossos estudos com o fim de verificar a possivel existencia dos grupos bacillares encontrados por NOGUCHI e que por acaso tivessem passado despercebidos ao nosso primeiro exame.

Temos agora a dizer que nos esfregaços corados pelo GIEMSA e nos cortes tratados pelo processo de HEIDENHAIN que serviram para o nosso primeiro trabalho, bem como em novos cortes corados pelo GIEMSA, após exame cuidadoso não encontrámos nada que pudesse ser identificado aos grupos bacillares assignalados pelo pesquisador japonês.

Verificámos sómente que as unicas formas que podiam ser interpretadas como bartonellas são as que descrevemos no nosso primeiro trabalho. Aproveitamos aqui para assignalar novamente, que dos nodulos dos nossos macacos conseguimos isolar a *Bartonella* em cultura pura.

A hypothese que nos parece mais accetavel para explicar os grupos bacillares descriptos por NOGUCHI em seus primeiros trabalhos, é de uma infecção secundaria. Aliás, esse mesmo autor assignala em trabalhos posteriores a invasão secundaria dos nodulos de verruga por bacterias e não se refere mais como sendo bartonellas, ás primeiras fórmulas por elle descriptas, mas sómente como taes as fórmulas encontradas dentro de cellulas endotheliaes.

EXPLICAÇÃO DAS ESTAMPAS 13—17.

- Nº 1 e 2—Photographia de 2 macacos (*Pseudocebus*) inoculados com cultura de *Bartonella bacilliformis*.
- Nº 3—Microphotographia de um preparado de cultura da *Bartonella bacilliformis* corado pela fuchsina.
- Nº 4—Microphotographia de uma cellula contendo uma grande inclusão. Além d'isso pode-se observar no plasma, principalmente no seu prolongamento bartonellas esparsas.
- Nº 5—Microphotographia de uma cellula contendo uma grande inclusão, tomando todo o plasma e podendo-se vêr na periphèria, *elementos bacilliformes* isolados. O nucleo da cellula, acha-se recalcado.
- Nº 6—Microphotographia de uma cellula com inclusões numerosas.
- Nº 7—Desenho de uma cellula com uma pequena inclusão e algumas bartonellas esparsas no plasma.
- Nº 8—Desenho de uma cellula contendo duas inclusões e algumas bartonellas esparsas.
- Nº 9—Desenho de uma grande cellula com inclusões numerosas e apresentando parte do plasma completamente invadido por bartonellas, enquanto que a outra parte, livre de bartonellas, conserva estructura normal.
- Nº 10—Desenho de uma cellula apresentando o plasma todo cheio de elementos bacilliformes e com o nucleo recalcado para a periphèria.
- Nº 11—Microphotographia de um corte de verruga obtida em macaco pela inoculação de cultura.
- Nº 12—O mesmo corte visto com maior augmento.



Fig. 2



Fig. 1

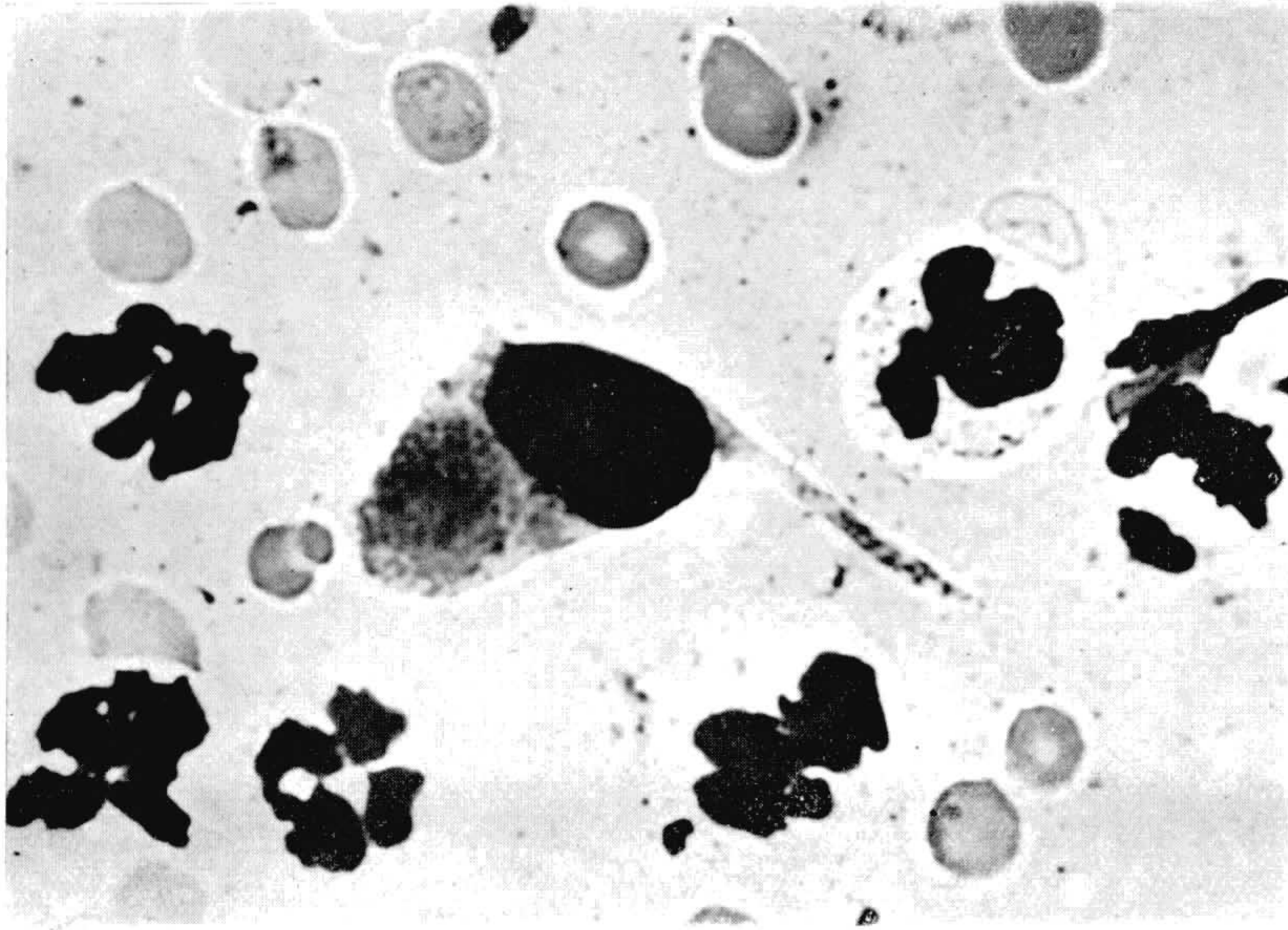


Fig. 4



Fig. 3

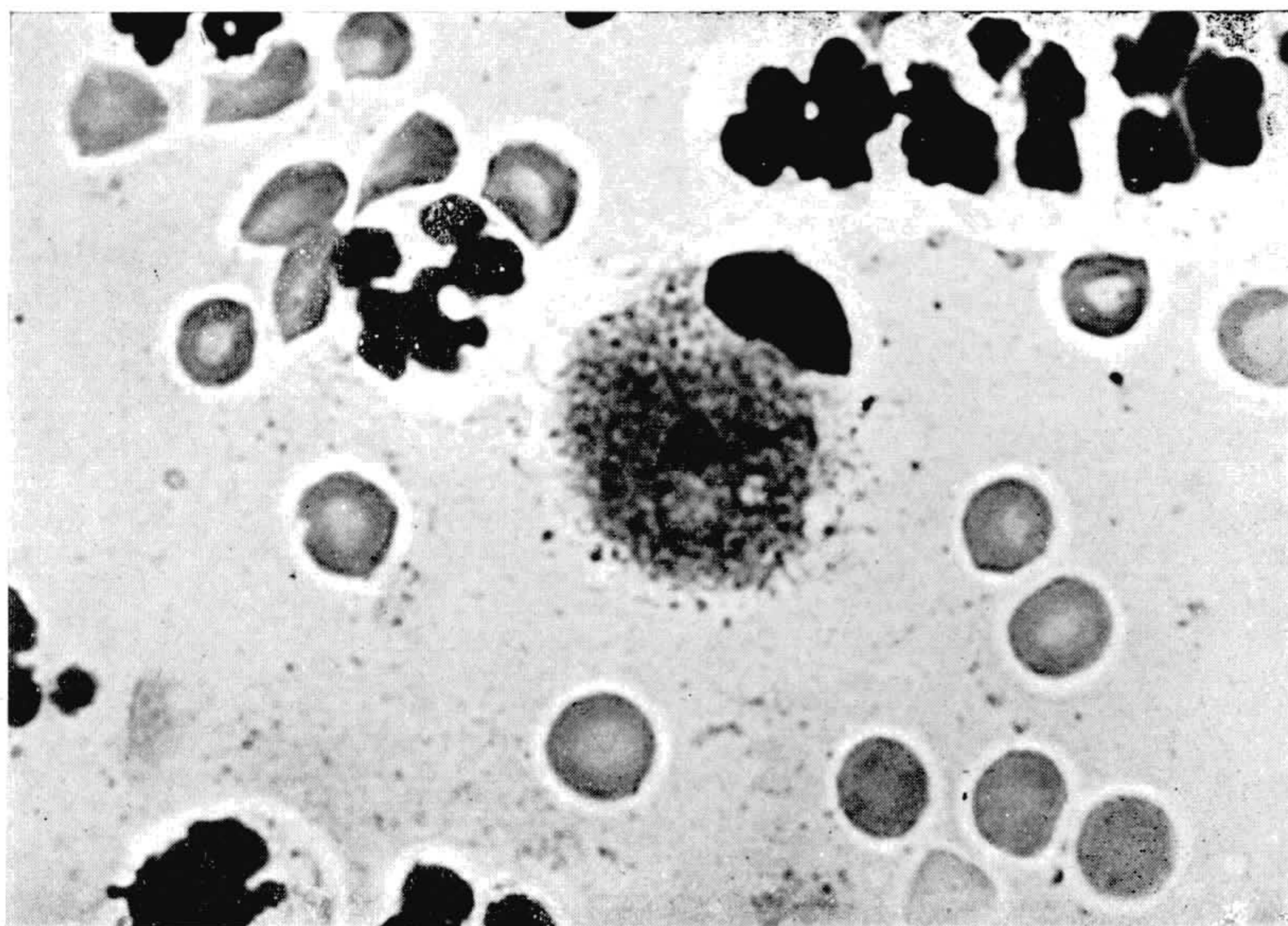


Fig. 5

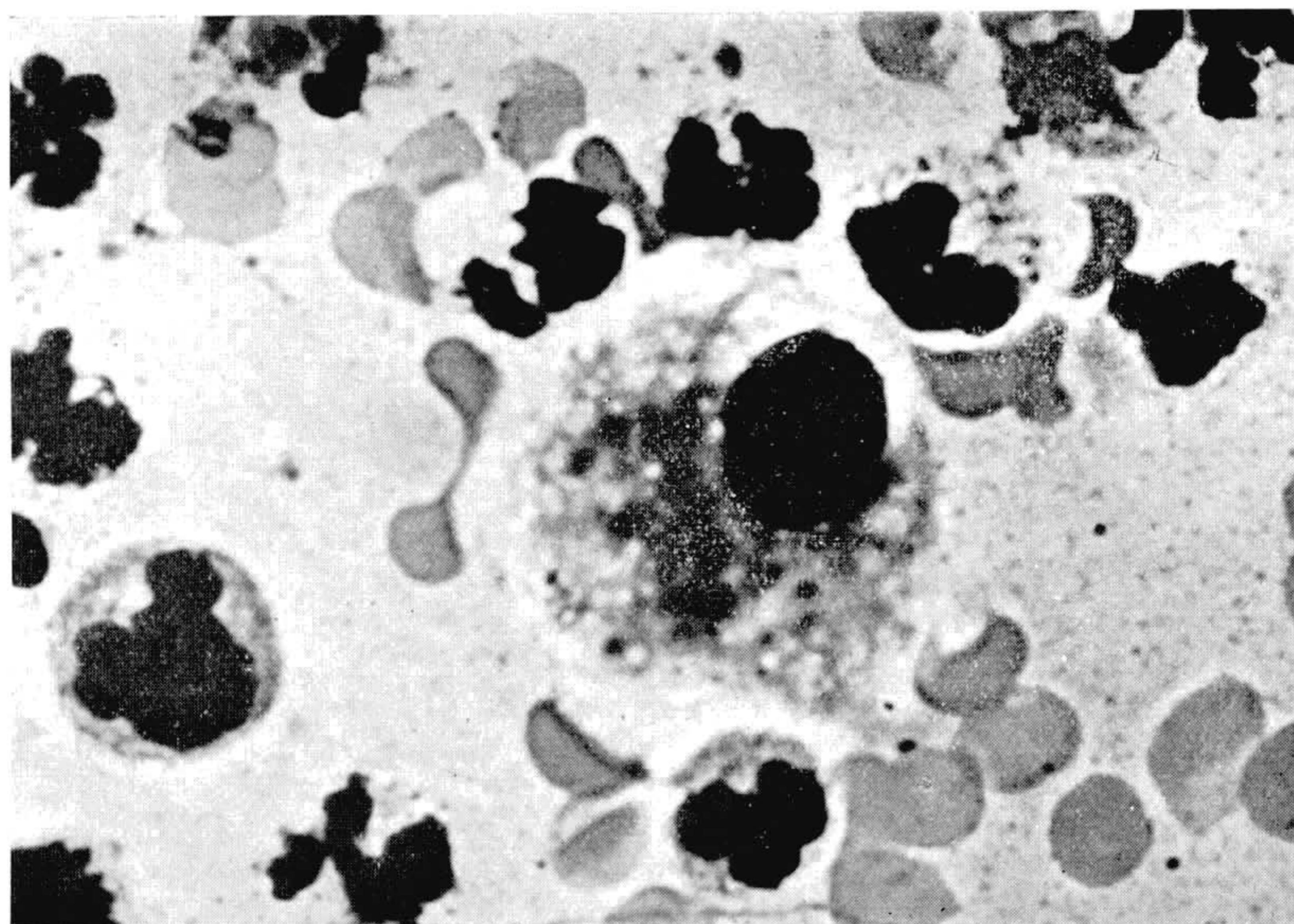
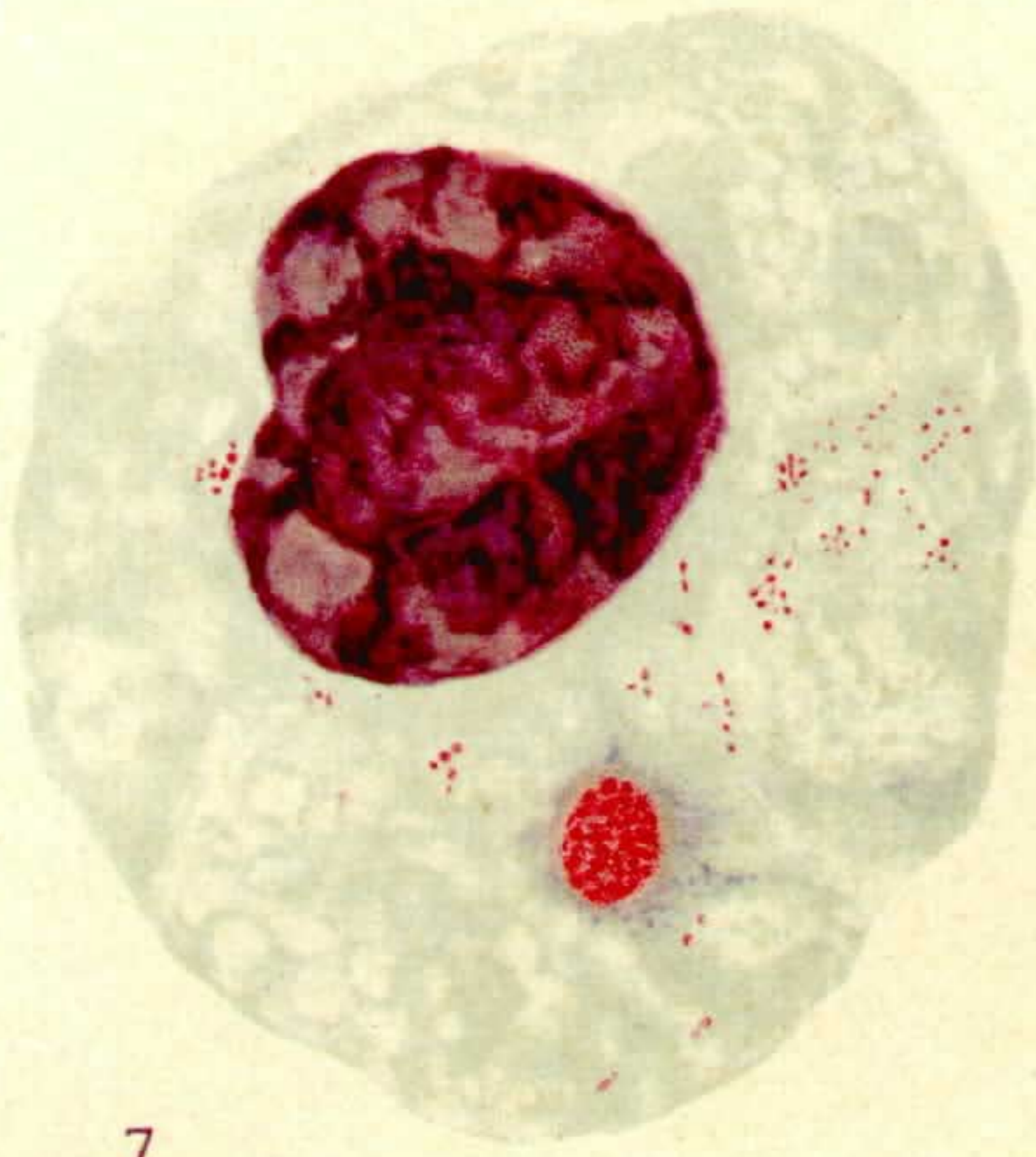


Fig. 6



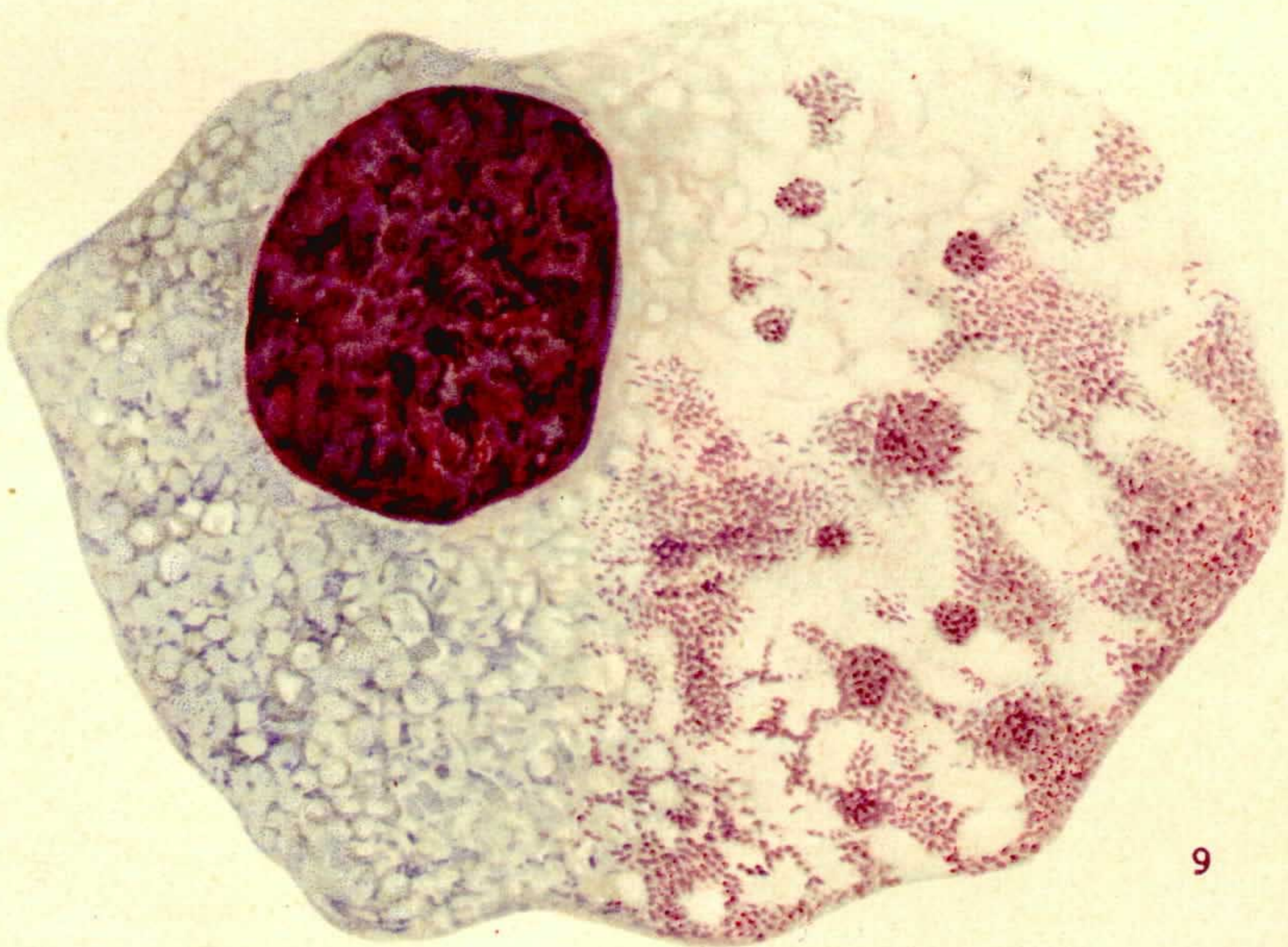
7



10



8



9

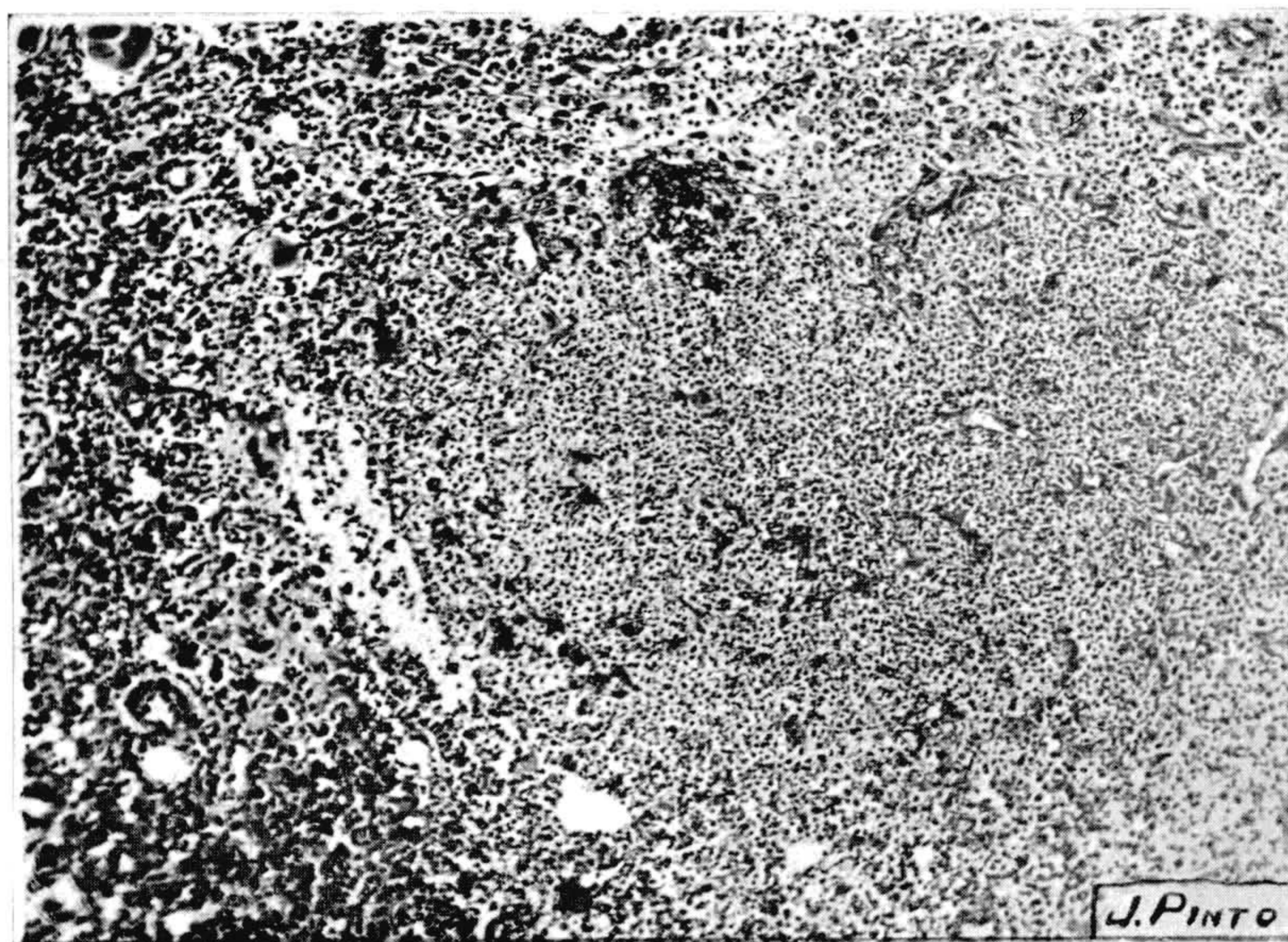


Fig. 11

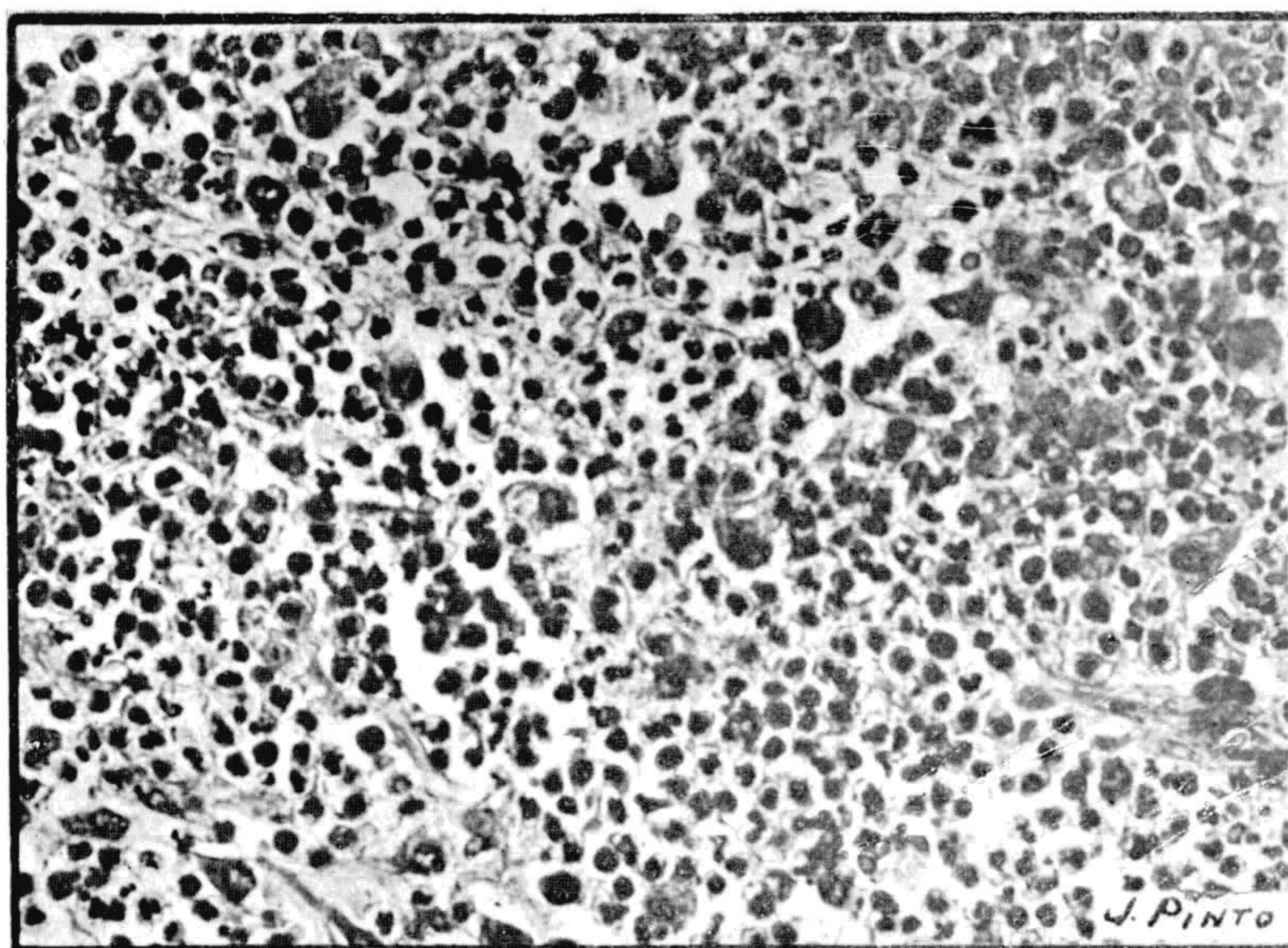


Fig. 12