

MEMORIAS
DO
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Tomo XXV

Maio — 1931

Fasciculo 2

Degeneração oxychromatica
(“inclusões intranucleares”) na febre amarella (*)

por

C. MAGARINOS TORRES

(Com as estampas XXVIII—XXX)

As memoraveis pesquisas de Stokes, Bauer e Hudson dando a conhecer a maneira segura de reproduzir a febre amarella em animaes de laboratorio, iniciaram uma phase verdadeiramente decisiva no estudo daquela molestia. Reaffirmaram ellas, em primeiro lugar, com abundancia de provas e contraprovas nunca dantes conseguidas, a doutrina segundo a qual o agente etiologico daquela affecção seria um virus filtravel e ultra-microscopico.

A rapida confirmação da descoberta dos autores americanos assegurou-lhe logo os fóros de verdade adquirida.

Não é nosso objectivo entrar no historico das pesquisas sobre a etiologia da febre amarella posteriores á descoberta de Stokes, Bauer e Hudson, mencionando apenas entre os mais proeminentes nessa primeira linha de estudos, os nomes de Aragão, Sellards e Hindle, Cunha e Muniz, Petit, Stefanopoulo e Frasey, Davis, Sawyer, Lloyd, Kitchen, Frobisher, etc.

Restabelecida em novas bases a doutrina etiologica da febre amarella, um problema magno se apresentava então, no dominio morphologico. Era elle: saber se, no grupo das doenças de virus filtravel, seria ou

(*) Recebido para publicação a 11 de Junho de 1930.

não a febre amarella uma affecção capaz de occasionar alterações peculiares e especificas da natureza das reconhecidas na raiva, vaccina, herpes, variola, epithelioma contagioso das aves, etc.

Tendo elle em vista, foi com grande interesse que iniciamos o estudo dos tecidos de *Macacus rhesus* infectados pelo virus da febre amarella isolado por H. de Beaurepaire Aragão de casos humanos da epidemia occorrida em 1928 no Rio de Janeiro, Brasil.

Assim, em communicacões apresentadas á Société Brésilienne de Biologie, nas sessões de 24 de Junho e de 29 de Julho de 1928 assignalavamos em um macaco morto cinco dias depois de inoculado com sangue de um doente de febre amarella a descoberta de inclusões intranucleares caracteristicas. Na primeira nota publicada nos Comptes Rendus de la Société de Biologie, referimos:

«La présence, dans le noyau des cellules du foie, d'inclusions acidophiles de même nature que celles qui ont été signalées dans l'herpès simplex, l'herpès symptomatique, la varicelle et le virus III du lapin, et décrites, parfois, sous le nom de dégénérescence oxychromatique». (Torres, 1928a).

Em notas apresentadas á Société Brésilienne de Biologie, nas sessões de 15 e 29 de Agosto, 14 e 26 de Setembro, assignalamos a hyperplasia dos nucleos attingidos pela degeneração oxychromatica e a conveniencia della distinguir estadios precoces de necrobiose das cellulas do figado encontrados quer em macacos inoculados, quer nos não inoculados (Torres, 1928 b), a occurrencia da degeneração oxychromatica em *M. cynomolgus*, a sua ausencia em macacos não inoculados (Torres, 1928 c), a abundancia de cellulas hepaticas com degeneração oxychromatica em animaes injectados com amostras brasileiras e examinados entre o 6º e o 10º dia de inoculação e a sua desaparicão gradual posterior (Torres, 1928 d), e, finalmente a importancia das inclusões intranucleares no diagnostico histopathologico da febre amarella em macacos inoculados com o virus brasileiro e nos quaes a não existencia das lesões descriptas como typicas por Stokes, Bauer e Hudson teria levado a rejeitar esses animaes como infectados pelo virus (Torres, 1928 h).

No Brasil Medico de 8 de Setembro de 1928 dizemos:

«Our results suggest the believe that yellow fever is a filterable virus disease in which typical inclusions are found only inside the nucleus (acidophilic intranuclear inclusions) as is the case with herpès zoster, symptomatic herpès, varicella and virus III infection of rabbits». (Torres, 1928f).

As conclusões dessas notas são reunidas em artigos publicados em Setembro de 1928 na *Sciencia Medica* (Torres, 1928 e) e em Outubro de

1928 no Suplemento das Memórias do Instituto Oswaldo Cruz (Torres, 1928 i).

Em 3 artigos publicados em Outubro de 1928, Hudson expõe a pathologia macroscópica, microscópica e comparada da febre amarella experimental baseando-a no estudo de sessenta e oito *Macacus rhesus* inoculados com a amostra africana «Asibi». Transcrevemos o que diz sobre as alterações do núcleo das células do fígado:

«Nuclear changes coincide with the changes of the cytoplasm. Large, poorly stained, vesicular nuclei with prominent nucleoli are found in the necrotic liver cells. In such nuclei, minute, dull red granules are often found. They were present in half the thirty specimens studied; in an additional six specimens, this type of nuclear change is less often present. Occurring in half the livers of this group, variable numbers of nuclei appear as small, round, intensely acidophilic dots. This form of degeneration is usually seen in the comparatively rare, small liver cell having smooth, intensely stained cytoplasm. The nucleus finally disappears in advanced necrotic cells either by lysis or karyorrhexis. In eleven specimens, karyorrhexis is common or marked, while in five others it occurs relatively infrequently. When karyorrhexis is marked, scattered nuclear debris is conspicuous in the hepatic cells throughout the section. Mitosis is not found». (Hudson, 1928b).

Esta descrição não difere, de modo essencial, do que se encontra no trabalho inicial de Stokes, Bauer e Hudson a propósito das alterações nucleares das células do fígado em macacos infectados, conforme se vê pela transcrição que fazemos:

«The extent of necrosis varied from a definitely limited midzone to a wide band of altered cells leaving only a fringe of non-necrotic cells about the portal area and central vein; sometimes even the central cells were acidophilic and granular. Necrosis of either the periportal or central areas alone was found in no specimen. The nuclei of the degenerated cells varied from being completely absent. Karyorrhexis was a common finding, and often the nuclei were small, round, and intensely eosinophilic. In some specimens the nuclei of altered cells contained peculiar small acidophilic granules. Mitotic figures were not seen». (Stokes, Bauer e Hudson, 1928).

Em nota apresentada á Société Brésilienne de Biologie na sessão de 26 de Dezembro de 1928 dizemos que a reacção nuclear de Feulgen negativa mostra que as inclusões nucleares possuem composição diversa da cromatina; notamos, além disso, o aspecto nitidamente diverso que apresentam nos preparados pelo methodo de Goodpasture, os nucleolos que se coram em vermelho e as inclusões nucleares, em azul violeta:

«Dans les noyaux ou celles-ci sont peu abondantes et divisées en deux ou trois corpuscules (stades initiaux), cette méthode révèle une structure réticulaire

très nette de ces corpuscules (inclusions nucléaires). Lorsque, dans la même préparation, on examine aussi les noyaux sans inclusions, on est tenté d'interpréter ces formations comme résultant d'une coagulation ou précipitation du nucleoplasme, l'acidophilie et la structure réticulaire des inclusions étant plutôt des arguments favorables à cette interprétation». (Torres, 1928 j).

Em artigo publicado em Março de 1929 no Suplemento nº 6 das Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, assignalamos differenças no aspecto das inclusões nucleares nos animaes inoculados com amostras brasileiras e africanas explicaveis por differenças na virulencia e adaptação ao macaco. Em uma estampa colorida representamos o nucleolo distinctamente conservado ao lado das inclusões intranucleares e dellas topographica-mente distincto mesmo nas phases terminaes da degeneração oxychromatica (Torres, 1929a).

Cowdry e Kitchen, em 1 de Março de 1929, assignalam a presença de inclusões intranucleares:

«Which bear a striking resemblance to those of Torres, in the liver cells of eight *Macacus rhesus* monkeys infected with the West African virus of yellow fever. They also occur, though less abundantly, in the suprarenal gland». Verificaram que «the inclusions are present as such in the living animal and do not in any sense represent the coagulating action of the fixative».

Assignalam ainda mais, o seguinte facto importante:

«Intranuclear inclusions like those seen in the monkey tissues were found in 22 of the total of 25» casos humanos de febre amarella examinados. (Cowdry e Kitchen, 1929).

Hindle, em artigo publicado a 9 de Março de 1929, diz:

«The oxychromatic changes in the nucleus result in the formation of acidophilic intranuclear bodies which Torres (1928) considers to be equivalent of those occurring in other diseases caused by filterable viruses, such as herpes, Virus III, etc.». (Hindle, 1929a).

Em 27 de Março de 1929 assignalamos a influencia do factor tempo e a da amostra de virus empregado sobre a apparição das inclusões nucleares; ao passo que ellas eram ausentes em macacos inoculados com a amostra brasileira mortos no 3º, por vezes no 5º e 6º dias de inoculação, eram constantemente presentes e ordinariamente abundantes em macacos *rhesus* infectados com a amostra africana, mortos no 3º, 4º, 5º, 6º, 7º e 9º dias (Torres, 1929 b).

No Brasil-Medico de 6 de Abril de 1929 assignalamos as inclusões especificas que anteriormente verificamos no macaco, em um caso humano de febre amarella fallecido 40 horas após os primeiros symptomas:

«As recentes verificações vêm estabelecer de modo definitivo que a febre amarella, sendo uma doença produzida por um virus filtravel deve ser collocada no «karyo-oikon group» da classificação de Lipschütz». (Torres, 1929c).

Em 1929, Hoffmann escreve no volume III do tratado de Kolle, Kraus e Uhlenhuth:

«Magarinos Torres hat vor kurzem in Rio in der Leber gelbfieberkranker Affen Veränderungen an den Zellkernen gefunden, die denen ähnlich sind, die bei Herpès zoster, Varizellen und verwandten Krankheiten auftreten und unter dem Namen der «acidophilen intranuclearen Inklusionen» oder auch als «oxychromatische Degeneration» beschrieben sind». . . «Über das Vorkommen solcher Einschlüsse in der Leber des Gelbfieberkranken Menschen ist noch nichts veröffentlicht. Ich habe meine sehr gut Gefärbten Schnitte von zahlreichen Gelbfieberfällen daraufhin genau durchgemustert, aber nur in einem Fall offenbar die gleichen fremden Einschlüsse in den Kernen der Leberzellen feststellen können». (Hoffmann, 1929a).

Em abril e em junho de 1929 publicamos figuras das inclusões intranucleares em macacos inoculados com as amostras brasileira e africana (Torres, 1929 d) e em um caso humano de febre amarella (Torres, 1929 e).

Hindle, em Maio de 1929, em uma discussão sobre virus filtravel, diz:

«It may be argued that yellow fever is not due to a filterable virus, but it falls into line with most of the others. You get the same eosinophilic inclusions and also it is filterable. . .» (Hindle, 1929b).

Reproduzimos em Junho de 1929 uma figura com alterações do nucleolo da cellula hepatica na febre amarella do homem. Percebe-se claramente, quer pelas figuras, quer pela descripção que as acompanha, que granulos intranucleares corados pela phloxina originarios do nucleolo podem simular os corpusculos intranucleares especificos. Essas alterações constituem causa de erro na identificação das inclusões intranucleares no homem. (Torres, 1929 f).

Hindle e Stevenson em nota publicada em 25 de Junho de 1929, referem a demonstração de inclusões nucleares oxychromaticas em córtes de figado de um caso humano de febre amarella e de um *M. rhesus* infectado (Hindle e Stevenson, 1929).

Penna e Figueiredo, em 15 de Julho de 1929, assignalam as inclusões nucleares acidophilas em 12 figados de macacos inoculados com virus da febre amarella (Penna e Figueiredo, 1929).

Hoffmann, em Agosto de 1929, publica um artigo sobre «Einchlüsse in den Leberkernen beim menschlichen Gelbfieber», cujo resumo é o seguinte:

«In einem menschlichen Gelbfieberfall aus Westafrika wurden die Einchlüsse in den Kernen der Leberzellen nachgewiesen, die von M. Torres bei Gelbfieber affen beschrieben sind. Wahrscheinlich handelt es sich bei diesen Einschlüssen um einen Entartungsvorgang des Kernes, aber es bleibt noch zu erforschen, ob der Erreger des Gelbfiebers für ihre Entstehung mit verantwortlich, vielleicht auch in ihnen versteckt ist». (Hoffmann, 1929b).

Pettit, em Outubro de 1929, escreve:

«Ces faits de structure se retrouvent dans les préparations de foies prélevés sur les *Macacus rhesus* morts de fièvre jaune et je ne puis que confirmer la parfaite exactitude des constatations de C. Torres. Toutefois, on notera que le processus, actuellement désigné sous le nom de dégénérescence oxychromatique, a été observé sous d'autres appellations par les histo-pathologistes en de nombreuses conditions pathologiques. Je l'ai signalé dans le foie d'animaux morts de trypanosomiasis...» (Petit, 1929).

Hoffmann, em Março de 1930:

«Last year C. Magarinos Torres of the Oswaldo Cruz Institute in Rio found certain inclusion bodies in the nuclei of the liver cells of Rhesus monkeys experimentally infected with yellow fever. Through his kindness I had the opportunity to see his preparations and when I studied the sections which I have of numerous human cases, I saw the same inclusions, though only in a few cases and in small numbers. But in one of them, a case from West Africa, they were as numerous as they are found in the liver of the monkeys, or in almost all the cells which are not attacked by the typical fatty or necrotic degeneration» (Hoffmann, 1930).

Cowdry e Kitchen publicam, em Março de 1930, extenso e detalhado estudo sobre as inclusões intranucleares na febre amarella. A comparação directa entre ellas e as do virus herpetico inoculado no figado de *Cebus hypoleucus*, a comparação indirecta com as inclusões no virus III, no virus submaxillar, na stomatite vesiculosa, na varicella e na doença de Borna, as reacções de coloração do nucleo nas cellulas hepaticas de macacos infectados, a descrição e o estudo microchimico das inclusões examinadas a fresco são alguns dos pontos mais interessantes referidos nesse importante artigo (Cowdry e Kitchen, 1930).

Finalmente, Theiler, descobrindo a receptividade do camundongo ao virus da febre amarella, assignala nas cellulas nervosas, inclusões nucleares acidophilas semelhantes ás vistas na cellula hepatica (Theiler, 1930).

MATERIAL E TECHNICA

O material examinado é constituido:

1º—pelos tecidos, em muitos casos apenas o figado, de cento e dezoito *Macacus rhesus*, de tres *M. cynomolgus* e de um *M. speciosus* infectados com o virus da febre amarella. Oitenta e dois *M. rhesus* receberam a amostra africana Asibi. Trinta e seis *M. rhesus*, tres *M. cynomolgus* e um *M. speciosus* foram injectados com amostras sul-americanas; dentre estes, dezenove *M. rhesus* e dois *M. cynomolgus* receberam a amostra brasileira F. W. A origem da amostra africana é descripta no artigo de Sawyer, Lloyd e Kitchen (1929) e a da amostra sul-americana no de Davis e Burke (1929).

2º—pelos tecidos de dezeseite casos humanos de febre amarella autopsiados no Rio de Janeiro, Brasil, durante a epidemia de 1928.

3º—pelos tecidos, especialmente o figado, de sete *M. rhesus* não inoculados.

4º—pelos tecidos, especialmente o figado, de treze *M. rhesus* injectados com material variado, como seja figado de doente de febre amarella, meios de Noguchi semeados (muitas passagens) com virus, cultura de *Bacillus typosus*, material de thrombo-endocardite parietal, etc.

5º—pelo figado de sete *Saimiri sciureus* injectados com virus da febre amarella.

6º—pelo figado de um cão intoxicado pelo phosphoro, de diversos cães inoculados com *Shizotrypanum cruzi* e de uma cobaya intoxicada pelo tetrachlorureto de carbono.

7º—pelos tecidos de quatro *Pseudocebus azarae* e de cinco coelhos inoculados com virus da febre amarella.

Obtivemos grande parte do material experimental por gentileza dos Drs. Carlos Chagas, H. de Beaurepaire Aragão, A. Marques da Cunha, J. Muniz, J. da Costa Cruz e J. Teixeira.

As autopsias foram realizadas por nós, pessoalmente, e, em alguns casos, em circumstancias especialmente favoraveis ao estudo histo-pathologico. Com effeito, em quatro casos, a autopsia foi iniciada vinte e tres, trinta, quarenta minutos e uma hora e dez minutos depois da morte. Foi possivel obter, na maioria dos casos, detalhadas informações sobre os symptomas clinicos e o periodo da molestia em que occorreu o obito. Ao corpo

clinico do Hospital Oswaldo Cruz, Drs. E. Chagas, A. Lobo e J. Teixeira, somos gratos pela collaboração prestada.

Foram usados os fixadores habituaes: liquido de Zenker com 5 por cento de acido acetico, Zenker-formol, fixador de Regaud, sublimado alcool de Schaudinn e formol a 10 por cento. Não notamos modificações nítidas no aspecto das inclusões attribuiveis ao fixador empregado. No material fixado em formol não obtivemos uma bôa coloração pela eosina e pela phloxine quer das inclusões, quer de outros componentes cellulares acidophilos, como geralmente acontece quando os tecidos permanecem muito tempo no formol. O inconveniente é diminuido quando a permanencia no formol é apenas de algumas horas.

Na maior parte dos tecidos estudados, o fixador usado foi o Helly ou o Zenker e o formol, sendo constantemente empregados dois fixadores como processo rotineiro.

O material foi incluído na parafina, sendo os cortes corados pela hematoxylina de Delafield e eosina, Bordeaux e hemalaun, azul polychromico de Unna, «Nuclealfärbung» segundo Feulgen, verde de methyla e pyronina de Pappenheim-Unna, phloxina, azul de methyleno alcalino de Unna, phloxina e azul de toluidina, fuchsina basica e azul de methyleno de Löffler e pelo methodo de Giemsa.

Reproduzimos o protocollo dos *M. rhesus* que serviram de contra-prova. Não foram injectados no Instituto Oswaldo Cruz, nem com virus da febre amarella, nem com qualquer outro material. Os exemplares eram convenientemente alojados e alimentados desde que chegavam ao Instituto. Entretanto a mortalidade em alguns lotes recebidos foi, por vezes, elevada, os animaes mostrando signaes evidente de mau tratamento.

Apresentam interesse os protocollos reproduzidos porque em alguns delles, observamos certas alterações nucleares (figs. 42, 43, 44, 45, 46 e 47) que consideramos como «necrobiotic (non specific) nuclear changes» e como «early stages in necrobiosis of liver cells».

«Which were observed in injected, as well as in uninoculated animals. Special reference to them is made here on account of the presence inside the nucleus of eosin-staining substances». (Torres, 1929a).

Ellas são encontradas com facilidade no *rhesus* 2618, existindo tambem no *rhesus* 2655.

Mais tarde Cowdry e Kitchen acharam as mesmas alterações em um caso de avitaminose. Dizem a proposito:

«It is possible that the changes in some of Torres animals resulted in some way from the action of the yellow fever virus, for he does not make clear, which

of the experimental procedures mentioned called them forth» (Cowdry and Kitchen, 1930).

Os documentos que agora apresentamos permitem a conclusão de que taes alterações nucleares não tem relação directa com o virus da febre amarella. Todos os macacos, importados do estrangeiro, eram collocados em gaiolas a prova de mosquito, dentro de um compartimento com portas e janellas teladas e provido de porta-tambôr (instalações do Dr. Aragão e dos Drs. Cunha e Muniz).

De facto encontramos tambem as referidas alterações nucleares em *M. rhesus* infectados, quaes o n° 24 C. Mn. (quadro VII, figs. 42, 46 e 47) morte precocemente sem symptomas, o n° 8 C. Mn. (quadro V, figs. 44 e 45) e o *M. rhesus* Ar. Tx. (quadro VII, fig. 43).

M. rhesus 2504 (28 de Junho de 1928). Importado pela Fundação Rockefeller no Brasil. Morto antes de inoculado (laboratorio do Dr. Aragão). A necropsia mostra um exemplar femea, adulto (velho ?), pesando 2250 grs., medindo 46 cms., da cabeça á base da cauda e 62 cms. da cabeça á extremidade da cauda.

Pesos e dimensões:

Figado	105 grs.
Baço	4 grs., medindo $4 \times 2 \times 1,5$ mms.
Rim direito	12,5 grs., medindo $4 \times 2,7 \times 2$ mms.
Rim esquerdo	11 grs., medindo $4 \times 2,5 \times 2$ mms.

O figado excede o rebordo costal de 5 mms.. No peritoneo, 13 c.c. de liquido amarello claro, limpido. No pericardio, cerca de 5 c.c. de liquido claro. Ganglio lymphatico axillar esquerdo medindo 12 mms. no maior diametro.

Diagnostico anatomico: Tuberculose ulcerativa chronica do pulmão esquerdo. Pleurite tuberculosa esquerda. Lymphadenite caseosa peribronchica. Tuberculose miliar aguda do pulmão direito, do figado, do baço, dos rins e da medulla ossea. Exemplares de *Oesophagostomum* (segundo o Prof. L. Travassos) no intestino grosso. Material fixado em Zenker acetico.

Exame microscopico: Os córtes de figado mostram congestão, leve degeneração gordurosa, e fócós de necrose de caseificação com intensa exsudação cellular. Não ha folliculos tuberculosos typicos. A não ser nas areas de necrose, os nucleos das cellulas hepaticas são normaes e não mostram degeneração oxychromatica.

M. rhesus 2599 (2 de Agosto de 1928). Morto, possivelmente de frio, antes de ser inoculado (laboratorio do Dr. Aragão). A necropsia não

mostra lesões macroscópicas apparentes. Os córtes de figado revelam extensa degeneração gordurosa periporta e necrose das cellulas hepaticas. A necrose traduz-se por eosinophilia do cytoplasma e karyolyse do nucleo não diminuido de volume. Além disso, congestão e pequenas hemorragias. Não ha colleções pequenas de polymorphonucleares. Não ha degeneração oxychromatica nas cellulas hepaticas.

M. rhesus 2614 (5 de Agosto de 1928). Morto antes de inoculado (laboratorio dos Drs. Cunha e Muniz). A autopsia mostra um exemplar mal nutrido com numerosos nodulos parasitarios nos pulmões e grosso intestino; no figado, com extensa degeneração gordurosa, existe um nodule solitario, circumscripto contendo um cestodio. Em nenhum orgão ha lesões suggestivas de tuberculose. Os córtes de figado mostram congestão e extensa degeneração gordurosa periporta. Não ha degeneração oxychromatica nem necrose evidente de cellulas hepaticas.

M. rhesus 2618 (10 de Agosto de 1928): Não inoculado. Morte espontanea (laboratorio do Dr. Aragão). A autopsia mostra um exemplar femea, jovem, bem nutrido, medindo 26 cms. da cabeça á base da cauda, pesando 1400 grs. *Conjunctivas pallidas*, *ganglios lymphaticos* superficiaes não augmentados; *peritoneo* parietal liso, humido e brilhante. Ambos os *pulmões* retrahidos, o pulmão direito adherindo ao diaphragma por adherencias firmes. Pela palpação não ha nodulos e a crepitação é presente. *Ganglios lymphaticos peribronchicos* não augmentados de volume. *Coração* normal, mostrando as cavidades direitas distendidas por coagulos sanguineos. Baço pequeno, firme, medindo $27 \times 15 \times 7$ mms. A capsula é delgada, a superficie do córte é secca e cinzenta avermelhadas. Folliculos lymphoides reconheciveis mas não augmentados. Figado augmentado de volume, medindo $85 \times 48 \times 38$ mms. Capsula delgada. Superficie do corte de cór violacea escura dando sahida a liquido sanguinolento; é esboçado o aspecto do figado «noz moscada». *Rins* de volume normal. O *rim* esquerdo mede $28 \times 18 \times 15$ mms.; o direito, $28 \times 18 \times 15$ mms. Ao corte, a camada cortical de cór amarella, pallida, é algum tanto alargada e tumefacta. A superficie do intestino grosso mostra diversos nodulos de cór cinzenta escura irregularmente esparsos.

Pesos:

Pulmão esquerdo	5 grs.
Rim esquerdo	4 grs.
Baço	2 grs.
Coração	9 grs.,5
Pulmão direito	5 grs.,5
Rim direito	4 grs.
Figado	62 grs.

Diagnostico anatomico: Nodulos parasitarios no intestino grosso. Congestão e degeneração gordurosa do figado. Degeneração dos rins. Pleurite fibrosa chronica adhesiva direita.

Exame microscopico: Os cortes de figado mostram congestão chronica passiva e extensa degeneração gordurosa periporta. Não ha necrose nas cellulas hepaticas, necrose traduzida por elementos arredondados, isolados, com cytoplasma acidophilo. Não obstante, em numero mais ou menos notavel de cellulas hepaticas, os nucleos apresentam uma coloração azul diffusa do nucleoplasma com lyse apparente da basichromatina intranuclear e bem assim alterações especiaes do nucleolo e a presença de substancias intranucleares coradas pela eosina, aspecto semelhante ao representado nas figs. 42 a 47.

M. rhesus 2638 (16 de Agosto de 1928). Não inoculado. Encontrado morto pela manhã (laboratorio dos Drs. Cunha e Muniz). A necropsia, realisada ás 14 hs., mostra um exemplar jovem, femea, mal nutrido, medindo 33 cms., 5 da cabeça á base da cauda, pesando 860 grs. Dentes pequenos e bem conservados. Ao corte, o tecido gorduroso subcutaneo é muito reduzido, quasi desaparecido. *Peritoneo* liso e brilhante. *Pulmões* retrahidos e livres de adherencias. No lobo superior e porção superior do lobo inferior do pulmão esquerdo, existem 5 a 6 pequenos nodulos parasitarios, amarellados, proeminentes, circumscriptos. Nodulos semelhantes existem tambem na superficie do lobo inferior do pulmão direito. A superficie do corte é secca e de côr rosea, não mostrando areas de consolidação. *Ganglios lymphaticos peribronchicos* não augmentados. Nas cavidades cardiacas, coagulos firmes de côr vermelha acinzentada. *Baço* mede $30 \times 15 \times 6$ mms. A superficie do corte é secca, de côr vermelha acinzentada pallida; os folliculos lymphoides são pequenos e vistos com difficuldade; o tecido intersticial parece normal. *Rim esquerdo* mede $26 \times 15 \times 12$ mms. e o direito $26 \times 16 \times 12$ mms. Em ambos, a superficie do corte é de côr vermelha acinzentada e a camada cortical algum tanto tumefacta. A tunica interna da aorta é lisa e levemente amarelada. *Ganglios lymphaticos mesentericos* com a forma e dimensões de grãos de arroz. *Figado* de côr vermelha acinzentada escura, com manchas violaceas, tendo a superficie do corte a mesma coloração e dando sahida a algum sangue. O conteudo de gordura não é augmentado de modo apparen-

Pesos:

Pulmão esquerdo

2 grs.

Rim esquerdo

2 grs.

Baço	1 gr.
Coração	3 grs.
Pulmão direito	2 grs.
Rim direito	2 grs.
Figado	31 grs.

Diagnostico anatomico: Congestão do figado. Degeneração dos rins. Nodulos parasitarios (numerosos) em ambos os pulmões. Cachexia (desnutrição ?).

Exame microscopico: Os cortes de figado apresentam pronunciada congestão. As cellulas hepaticas não mostram degeneração oxychromatica, nem degeneração gordurosa nem necrose evidentes.

M. rhesus 2655 (22 de Agosto de 1928). Não inoculado. Encontrado morto pela manhã (laboratorio dos Drs. Cunha e Muniz). A necropsia, realisada ás 14 horas, mostra um exemplar macho, pequeno, mal nutrido, pesando 1200 grs. e medindo 37 cms., 5 da cabeça á base da cauda. Os pulmões não mostram tuberculose, bronchopneumonia, nodulos parasitarios nem pleurite fibrosa chronica. No coração, dilatação da auricula e coagulos vermelhos escuros nas cavidades. Não ha hemorragias, nem nas serosas, nem no parenchyma pulmonar. Nodulos parasitarios nas paredes do intestino grosso. Baço mede $35 \times 16 \times 7$ mms. *Figado* de côr vermelha acinzentada escura com uma grande mancha violacea na face antero superior. A superficie do corte mostra congestão chronica passiva. O *rim direito* mede $26 \times 18 \times 13$ mms.

Pesos:

Pulmão esquerdo	5 grs.
Rim esquerdo	5 grs.
Baço	2 grs.
Coração (sem coagulos)	7 grs.
Pulmão direito	5 grs.
Rim direito	5 grs.
Figado	38 grs.

Diagnostico anatomico: Congestão chronica passiva e degeneração gordurosa do figado. Nodulos parasitarios nas paredes do intestino grosso. Desnutrição (?).

Exame microscopico: Os cortes de figado mostram congestão e extensa degeneração gordurosa periporta. A disposição das traves hepaticas acha-se modificada: em muitos pontos apparecem cellulas isoladas, como que dissociadas. A necrose das cellulas hepaticas traduz-se por pycnose

do nucleo (muito frequente) e acidophilia do cytoplasma. Em algumas cellulas, os nucleos mostram chromatolyse e coloração azul do nucleoplasma. Não ha cellulas hepaticas com degeneração oxychromatica.

MORPHOLOGIA DAS INCLUSÕES NOS MACACOS INFECTADOS

Cowdry (1928) acha conveniente designar as formações cellulares especificas das doenças produzidas por virus filtraveis pelo nome de «corpusculos x», imitando o proceder dos botanicos em relação a estruturas cellulares cuja composição permanece obscura.

E' geralmente acceto que taes «corpusculos x» representam, em parte seguramente, «productos de reacção» formados á custa de porções componentes da propria cellula. Goodpasture (1925 b), em estudo experimental sobre a raiva conclue achando que, no coelho, os «lyssa bodies» e os corpusculos de Negri, em parte, provem de alterações das neurofibrillas e do chondrioma da cellula nervosa.

Na febre amarella «it seems evident fever the material which constitutes the yellow fever «inclusions» may partially at least be composed of coagulated nucleoplasm, being surely of a different structure and composition from the two nuclear constituents, chromatin and nucleolus» (Torres, 1929a).

Embora julguemos as «inclusões intranucleares» da febre amarella simplesmente um processo degenerativo especifico, usaremos muitas vezes, por commodidade de expressão, do termo «inclusões».

Só podemos dar conta do que observamos em material submettido á acção dos fixadores usuaes e no qual teremos forçosamente a considerar um reticulo (a «linina» dos antigos histologistas), a basichromatina, a oxychromatina, etc.

Assim sendo, tendo Cowdry e Kitchen (1929 e 1930) verificado que os corpusculos existem na cellula viva e não representam um artefacto, o exame dos preparados fixados permite affirmar que se nelles, agora, elles representam um artefacto, este possuiue características assaz uniformes e fixas. Isso justifica um estudo accurado em taes condições.

E' indispensavel fazer referencia ao aspecto que o nucleo normal da cellula hepatica apresenta quando corado pelo processo de coloração usado no estudo das inclusões. Com effeito, tal aspecto é variavel, não só conforme a especie animal, como segundo o methodo de coloração usado.

Assim, no *Hapale pencillata*, no cão e na gallinha, a oxychromatina é assaz conspicua, sendo vista em preparações coradas pela hematoxylina-eosina. No *Macacus rhesus*, porém, a oxychromatina é escassa e nem sempre vista nos cortes corados pela hematoxylina-eosina. E' posta, com mais

facilidade, em evidencia nos preparados corados pela phloxina e azul de toluidina (fig. 66).

E' possivel que a oxychromatina varie de quantidade no nucleo normal, de animal para animal, e talvez, conforme a idade do exemplar.

Com effeito, Buehler, « étudiant la chromaticité des noyaux dans les cellules nerveuses, a vu que les jeunes cellules des embryons ont un noyau riche en basichromatine, que l'oxychromatine y parait ensuite et augmente de quantité avec l'âge » (Prenant, Bouin et Maillard, 1904).

Quer a forma, quer as dimensões do nucleo normal da cellula hepatica do *M. rhesus* tomadas nos cortes histologicos de espessura media de 6 apresentam sensiveis variações.

Assim, conforme a orientação do corte, a fórmula do nucleo é, ora redonda, ora ligeiramente oval; esta ultima é a que elles geralmente apresentam geralmente no corte.

Variações ligadas ao plano do corte mostram igualmente as tomadas em diversos nucleos colhidos ao acaso em um mesmo corte:

nucleo	I —	10 × 6	μ
»	II —	9 × 6,5	μ
»	III —	9 × 6,5	μ
»	IV —	9 × 6	μ
»	V —	9 × 6	μ
»	VI —	8 × 6	μ
»	VII —	8 × 5	μ
»	VIII —	7 × 5,5	μ
»	IX —	7 × 5	μ
»	X —	5 × 5	μ

Em cortes corados pela phloxina e azul de toluidina, a membrana nuclear cora-se em azul escuro com particulas de basichromatina nella encrustadas; não é raro ver-se uma dessas particulas mais volumosa que as outras (fig. 66).

O reticulo de linina cora-se em violeta claro e insere-se sobre a membrana nuclear. Apresenta particulas de basichromatina mais intensamente coradas em violeta regularmente distribuidas pelo reticulo de linina, situadas, aparentemente, nos pontos de intersecção do reticulo (fig. 66). As malhas do reticulo de linina são assaz regulares em suas dimensões.

Na maior parte dos nucleos existem algumas particulas de basichromatina mais volumosas que as outras e situadas mais proximo da membrana nuclear do que da porção central do nucleo (figs. 1, 2 e 12).

As outras particulas menores, de fôrma irregular, apresentam tambem uniformidade notavel de dimensões (figs. 2 e 66).

A oxychromatina apresenta-se sob a fôrma de massas homogeneas, de extensão variavel e limites por vezes difficeis de precisar; coram-se de modo nitido pela phloxina e com diversa intensidade no mesmo nucleo. A sua sede mais constante é a proximidade da membrana nuclear e do nucleolo.

A oxychromatina no nucleo normal tambem se encontra no nucleoplasma em zona intermediaria entre membrana nuclear e nucleolo; *ella simula, não raro, quando os preparados são examinados com Obj. imm. 1/12, 100 × e Oc. periplan. 4 × Leitz, granulos acidophilos ou filamentos acidophilos.*

Insistimos, de proposito, nesse aspecto de granulos e de filamentos que parece ter a oxychromatina no nucleo normal, quando examinado com aquelle augmento, porque elle se modifica quando as mesmas estruturas, no mesmo nucleo, são examinadas com Obj. imm. 1/12, 100 × Leitz e Oc. periplan. 25 × B, Leitz, empregando como iluminação a luz branca da «Speziallampe» Leitz de baixa tensão, «Nitra» (6 volts, 6 amp.). Vê-se então que o «granulo» corresponde a uma area mais ou menos irregular de oxychromatina preenchendo uma ou mais malhas do reticulo de linina (v. fig. 66). Quanto aos filamentos, elles nada mais são do que porções do reticulo de linina em cuja visinhança immediata se condensou estreita orla de oxychromatina.

Assim, repetimos: examinado com 500-800 diametros, o nucleo da cellula hepatica normal apresenta, por vezes, filamentos de oxychromatina, bem como granulos acidophilos; elles são, porém, um falso aspecto, conforme demonstra o exame com iluminação artificial (luz branca) e augmento de 2000-2500 diametros.

Em taes condições, verifica-se uma substancia acidophila occupando as malhas do reticulo de linina ou a visinhança de filamentos do reticulo.

O nucleoplasma que occupa as malhas do reticulo de linina é transparente e sem estruturas, nas zonas onde não existe oxychromatina.

O nucleolo geralmente unico, é quasi sempre excentrico (figs. 1, 2, 12 e 66). A sua estrutura é melhor evidenciada nos preparados corados pela phloxina-azul de toluidina. De fôrma levemente irregular, elle é formado de duas substancias distinctas (fig. 66): uma, mais intensamente corada em azul escuro, occupa as suas margens onde constitue duas ou tres particulas de contornos irregulares, ás vezes formando estreita faixa ou orla na periphèria do nucleolo. A porção restante do nucleolo cora-se mais fracamente e de modo homogeneo, tingindo-se em uma bella

côr azul da Prussia pelo methodo acima referido (figs. 50 e 51); é ella que constitue a porção consideravel do nucleolo e toda a sua zona central.

As primeiras modificações no nucleo em que se formam as inclusões da febre amarella constam da apparição simultanea, em dois, tres e mais pontos do nucleoplasma (figs. 4, 5, 13, 19, 26, 27 e 70), nas malhas do reticulo de linina, de uma nucleoproteina basica que se cora em carmim pelo bordo e em roseo pela eosina e phloxina. No inicio tal substancia deve corresponder, provavelmente, a um augmento da oxychromatina do nucleo normal; quando, porém, em estadios mais avançados, a sua quantidade se torna consideravel, é provavel que ella seja formada tambem, por outras nucleoproteinas acidophilas não visiveis no nucleo normal. E', assim, provavel que a substancia intranuclear acidophila que entra na formação das inclusões da febre amarella não seja uma unica especie de nucleoproteina, mas uma mistura de nucleoproteinas derivadas do nucleoplasma em condições anormaes.

Tal substancia acidophila geralmente não constitue uma substancia corada de modo homogeneo e uniforme; nos preparados pela phloxina e azul de toluidina, em outras porções a côr é roseo avermelhado, em outras roseo amarellado ou côr de laranja (figs. 70 e 71).

E' importante, para a comprehensão da natureza das alterações nucleares de que nos occupamos, estabelecer, com precisão, as relações que, de inicio, taes modificações nucleares especificas apresentam com as estruturas ou artefactos provenientes da acção dos fixadores.

No inicio, as massas atraz mencionadas de nucleo-proteinas acidophilas estão situadas apenas dentro de algumas malhas do reticulo de linina. Este ultimo é bem conservado e facilmente reconhecivel no interior da substancia acidophila (fig. 70).

Empregando a Oc. periplan. 25 \times e a Obj. imm. 1/12, 100 \times de Leitz e a luz branca da «Speziallampe» Nitra (6 volts, 6 amp.) de Leitz, tendo ainda o cuidado de manobrar o diaphragma-iris, não são reconhecidos como formando a inclusão, quer minuscultas particulas acidophilas individualisadas, quer granulos, quer estruturas parecidas com ricketsias, mas apenas a nucleoproteina acidophila mencionada occupando as malhas de um reticulo de linina bem conservado (fig. 70).

Em um estadio mais adiantado, as nucleoproteinas acidophilas são mais abundantes, occupando, portanto o reticulo de linina em maior extensão e apresentando determinadas alterações (fig. 71).

Em lugar de tres ou quatro massas separadas, as nucleoproteinas acidophilas formam apenas duas massas irregulares distinctas (figs. 6,

de nucleoplasma claro (figuras em «borboleta») ou então uma única massa de forma aproximadamente semilunar (figs. 7, 14 e 71).

O reticulo de linina dentro da inclusão é algum tanto tumefacto e menos aparente do que em condições normaes, mostrando, comtudo, relativamente conservadas e ainda coradas particulas de basichromatina. A maioria dellas, porém, cora-se cada vez menos intensamente pelo hemalaum, apesar de que é sempre sensível reconhecer algumas particulas mesmo em estadios adiantados da degeneração oxychromatica (figs. 15, 16, 22 e 72).

Estas particulas de forma irregular, mas de dimensões assaz uniformes, dão um aspecto granuloso ás inclusões (figs. 4, 5, 6, 16, 28 e 71); estes granulos, comtudo, são nitidamente basophilos e deixam-se, com facilidade, se identificar a particulas de basichromatina que fazem parte do reticulo de linina (fig. 71). Nas inclusões bem constituídas, o reticulo de linina e as particulas de basichromatina deixam-se melhor evidenciar em preparações coradas pela fuchsina basica e azul de Loeffler, pelo Bordeaux hemalaum ou pelo hemalaum simples.

Para conveniencia da descripção, devemos considerar, na inclusão typica e perfeitamente constituída, uma «substancia fundamental» e um «estroma».

A «substancia fundamental» corresponde ás nucleoproteinas acidophilas acima mencionadas; são estruturas, em parte, presentes no nucleo normal das cellulas hepaticas, taes a oxychromatina; em parte representam nucleo-proteinas que se originam no nucleoplasma a favor de condições anormaes. Formando a substancia fundamental não existem, de modo algum, particulas minusculas ou granulos acidophilos, mas apenas a substancia acidophila de extensão variavel ocupando uma (fig. 70) ou mais malhas (fig. 71) do reticulo de linina. Em cortes examinados com o augmento de 600 a 800 diametros, esta substancia, quando o campo microscopico é fortemente illuminado, contrasta com o arcabouço de linina em cujas malhas está situada e assim adquire contornos nitidos e um falso aspecto de granulos acidophilos (fig. 18).

O «estroma» corresponde ao arcabouço de linina o qual apresenta as seguintes alterações:

1º—tumefacção e deformação do reticulo de linina; 2º leve tumefacção e lyse da basichromatina ahi incrustada (fig. 72).

A «substancia fundamental» apresenta as seguintes características, sendo claro que as reacções de coloração estabelecidas por Cowdry e Kitchen (1930) no quadro II para as inclusões, dizem respeito a essa substancia.

Na «Nuclealfärbung» segundo Feulgen, a «substancia fundamental» permanece sem coloração (fig. 49), de modo que não deve conter quantidade apreciavel de acido thymonucleino tal como a chromatina. Comtudo, esparsas no seu interior, apparecem diversos granulos levemente corados e algum tanto indistinctos, que correspondem, provavelmente, a particulas de basichromatina do «stroma» em via de soffrerem lyse.

Experimentados os «Farben-index» de Unna, a substancia fundamental apresenta as reacções de uma albumina cellular basica. Não se cora pelo azul de methyleno polychromico de Unna, nem pelo verde de methyla. O «Farbe-index» bordo e hemateina-alume indica que ella é uma albumina nuclear basica corada em carmim pelo bordo, ao passo que a mesoplastina se cora em azul (Unna, 1928, 18).

Em cortes desparafinados e tratados durante 24 horas por uma solução aquosa a 5 por cento de acido chlorhydrico, lavados em agua distillada durante horas e corados pelo bordo e hemalaum, as inclusões apparecem bem conservadas.

O mesmo resultado é conseguido quando usadas concentrações mais fortes de acido chlorhydrico, como sejam, soluções a 15, 20 e a 30 por cento. Apenas uma leve dissolução da mesoplastina (chromatina) é observada nessas condições, mas nunca uma dissolução completa e a evidenciação da «letzte Grundlage des Kernes» ou da «Zellenrumpf» tal como menciona e representa Unna (Unna, 1928, pg. 20).

Resultados semelhantes foram obtidos tratando os córtes desparafinados por uma solução aquosa a 1 por cento de carbonato de sodio.

As alterações nucleares que acabamos de descrever correspondem ás inclusões da febre amarella; conforme se viu, taes lesões occorrem apenas em pontos limitados do nucleoplasma.

A porção restante do nucleoplasma forma um espaço claro em torno da inclusão separando-a da membrana nuclear (figs. 7, 15, 22, 28 e 71). Neste halo caracteristico, é possivel, na maioria dos casos, manobrando o diaphragma iris e usando fortes augmentos e illuminação com a «Speziallampe» de Leitz, reconhecer porções bem coradas, embora escassas, do reticulo ainda inseridas, de um lado sobre a membrana nuclear, e de outro sobre a inclusão em continuidade directa com o seu «stroma» (figs. 67 e 71).

E' possivel que o reticulo de linina, soffrendo alterações regressivas ou seja uma necrose parcial, permaneça retrahida na parte central do nucleo, ahi constituindo a inclusão (fig. 72); esta inclusão é então, mantida em posição fixa e immovel, graças a remanescentes do reticulo de linina, ainda em parte, não alterados e que se inserem sobre a membrana

nuclear (figs. 7, 20, 51 e 67). Alguns detalhes referidos nas observações de Cowdry e Kitchen sobre inclusões na cellula viva, não discordam dessa suposição.

Outra alteração nuclear associada á presença das inclusões é o augmento de volume da basicromatina situada perto ou sobre a membrana nuclear.

Em macacos injectados com amostra virulenta de virus de febre amarella, esta lesão era muito evidente (figs. 31, 32, 33 e 34), ao passo que era menos accentuada em exemplares injectados com amostras de fraca virulencia (figs. 23, 24 e 25), sendo discreta nos casos humanos (figs. 62, 63, 64, 65 e 68).

Até agora, essa alteração nuclear tem sido referida nas doenças de virus como representado uma deposição marginal da chromatina nuclear ou como um augmento da chromatina situada na membrana nuclear em consequencia da opposição de nova chromatina.

E' possivel que essa explicação seja verdadeira no que respeita a outras inclusões nucleares que não tivemos oportunidade de estudar, como as do herpes, virus III do coelho, varicella, etc.

No que respeita á inclusões da febre amarella, essa hypothese parece-nos pouco accetavel, visto como sempre pudemos verificar particulas de basicromatina ainda reconheciveis no stroma das inclusões, mesmo em phases avançadas da degeneração oxychromatica, quando já era muito accentuada a chamada «marginação» da chromatina sobre a membrana. Por outro lado repugna-nos admittir que taes particulas de basicromatina, depois de soffrerem alterações necroticas mais ou menos accentuadas (lyse) e portanto terem apresentado modificações chemicas de maior ou menor importancia, sejam ainda capazes de se fusionar e constituir uma mesma substancia chimica com a basicromatina da membrana nuclear, a qual nas primeiras phases da degeneração oxychromatica é geralmente conservada e bem corada.

Comprehendemos melhor as figuras 30, 31, 32, 33, 34 e 72 quando admittimos que ellas representam, simplesmente, uma *tumefacção local* da basicromatina que, em condições normaes, se encontra localisada sobre ou perto da membrana nuclear.

Nos estadios iniciaes (figs. 20 e 70), essa tumefacção não é ainda bem apreciavel, sendo que, nesses estadios, as alterações regressivas interessam apenas, uma porção circumscripta do nucleoplasma. Mais tarde, contudo, ella se torna cada vez mais accentuada (figs. 23, 24 e 25) ao passo que as alterações cellulares regressivas ganham progressivamente outros componentes nucleares e, mais tarde, o cytoplasma.

Tal alteração nuclear não constitue facto excepcional em cytologia, tendo sido uma tumefacção local da chromatina sobre a membrana nuclear desde a longa data assignalada por Pianese (1896) em cellulas de tumores.

Os nucleos augmentam de volume não só nas primeiras phases (fig. 70), como mais tarde, quando encerram inclusões bem desenvolvidas. Assim, na fig. 23, elle mede 12 por 8,5, ao passo que na fig. 12, o nucleo normal de uma cellula hepatica mede 6,5 de diametro. Em virtude desse augmento, os nucleos se alongam (figs. 21 e 23), alguns se tornam enrugados «as if the nuclei had lost water» (Cowdry and Kitchen).

Não conseguimos um material favoravel ao estudo dos estadios terminaes da degeneração oxychromatica. Mesmo nos preparados de figado nos quaes mais de 90 por cento das cellulas hepaticas continham inclusões, os estadios terminaes mostram-se surprehendentemente escassos. Consideramos estadios terminaes, não os representados nas figs. 25 e 72, mas aquelles em que toda a membrana nuclear é desaparecida.

Em algumas circumstancias raras, verificamos cellulas hepaticas com a membrana nuclear mais ou menos conservada, ao passo que o seu conteúdo acidophilo não era mais visivel (fig. 38). Não é facil interpretar taes aspectos; é possivel que elles resultem de um artificio de technica. De outro lado elles recordam os «empty nuclei» encontrados no homem (fig. 60).

Pesquizamos as inclusões, juntamente com Penna de Azevedo, nas capsulas suprarenaes, tendo ahi encontrado alterações do conteúdo acidophilo do nucleoplasma em cellulas da camada cortical, assaz suggestivas de inclusões. Consideramos, comtudo, esses aspectos representados nas figs. 37 e 40 como não concludentes.

Constituindo, de accôrdo com as autoridades, causa de erro em pathologia intracellular, a confusão entre alterações nucleolares e inclusões intranucleares especificas, e um dos enganos que tem concorrido para desacreditar o valor das alterações cytologicas verdadeiramente especificas nas doenças causadas por virus filtraveis, foi nosso cuidado primordial verificar qual o modo de se comportar do nucleolo nas cellulas hepaticas do *Macacus rhesus* em que descreviamos corpusculos intranucleares especificos da febre amarella.

Esse estudo não offerece difficuldade em virtude da abundancia com que são encontrados os corpusculos especificos, não sendo raro observar cortes de figado nos quaes a quasi totalidade das cellulas hepaticas os apresenta. Tambem, no macaco, as alterações nucleares não são tão proemi-

mentos como no homem (figs. 5, 6, 7, 14, 15, 16 e 19), sendo que o nucleolo aparece nitidamente distinto quer topographicamente, quer pelas reacções de coloração das inclusões, mesmo em estadios adiantados da degeneração oxychromatica.

A distincção entre nucleolos e corpusculos especificos apparece, porém, com grande evidencia nos preparados corados pelo methodo de Goodpasture para corpusculos de Negri (Goodpasture, 1925).

1—Os córtes desparafinados são corados, durante 10 minutos em uma solução a 0,5 % de fibrina basica em alcool a 20 %, a qual, na occasião de usar se deve juntar 1 % de oleo de anilina.

2—Lavar rapidamente em agua corrente, enxugar com papel de filtro e differenciar em alcool a 95°.

3—Lavar e corar durante alguns segundos pelo azul de methyleno de Loeffler preparado recentemente.

4—Lavar. Deshydratar no alcool absoluto. Xylol. Oleo de cedro. Balsamo.

O methodo dá melhores resultados em material fixado no liquido de Zenker. Em material fixado no formol a 10 % obtem-se uma coloração diffusa e intensa dos tecidos pela fuchsina; esta exige uma differenciação prolongada pelo alcool a qual as mais das vezes acarreta o descoramento do proprio nucleolo. Em taes condições, obtivemos bom resultado fazendo uma differenciação muito rapida em alcool a 90° adicionado de 10 gottas de acido acetico para cada 60 c.c. (Goodpasture-acetico).

Quando os corantes são recentes e a differenciação foi conduzida de modo conveniente, a unica estrutura que apparece corada pela fuchsina nas cellulas hepaticas normaes do *M. rhesus*, é o nucleolo; a sua coloração, em vermelho vivo, contrasta fortemente com a da chromatina, em violeta, e a da membrana nuclear, em azul.

Nas cellulas hepaticas de macacos infectados pelo virus da febre amarella, os corpusculos especificos tingem-se em tonalidades intermedias entre o azul e o violeta, contrastando de modo accentuado nas mesmas cellulas com o nucleolo tinto em vermelho (figs. 4, 5, 6, 7 e 67).

Pelo seguinte processo obtem-se um contraste nitido de coloração entre nucleolo e corpusculo intranuclear especifico; o primeiro, reveiando os detalhes de estrutura de um amphinucleolo, conforme verificaram Cowdry e Kitchen, se apresenta em azul escuro e em azul da Prussia; o segundo se cora em rosa (substancia fundamental) com granulações violeta claro (caryosomos do «stroma»).

1—Fixar no Zenker-acido acetico ou no Helly e incluir em para-

fina. Cortes de 4—6 de espessura, desparafinados, passados em alcool a 70° iodado, descorados no alcool a 70°, levados á agua.

2—Corar durante 10 minutos em uma solução aquosa a 1 por cento de phloxina.

3—Lavar e corar durante 10 minutos em uma solução aquosa a 1 por cento de azul de toluidina (de preferencia, antiga).

4—Enxugar o excesso da agua e differenciar por agitação continua no alcool a 90° contido em um tubo de Borrel até que reapareça inteiramente a coloração rosea dos tecidos.

5—Alcool absoluto. Xylol. Oleo de cedro. Balsamo. Laminula.

Em cortes corados pela phloxina azul de toluidina, o nucleo da cellula hepatica normal de *M. rhesus* apresenta geralmente um nucleolo unico tinto em azul quasi negro, com contornos mais escuros; prolongando-se mais a differenciação, nota-se no nucleolo a estrutura referida anteriormente na descripção do nucleo normal. A basicromatina e a membrana nuclear revestem tonalidades diversas do azul e violeta.

Na cellula hepatica de *rhesus* inoculado com virus da febre amarella na qual sobrevem os corpusculos nucleares especificos, as alterações nucleolares podem ser, assim, summariadas:

a) *tumefacção e separação dos componentes nucleolares:*

O nucleolo augmentado de volume mostra separação de seus componentes normaes que formam duas porções juxta-postas; uma dellas é menor, sendo formada pelos componentes chromophilos do nucleolo fortemente corados em azul escuro. A «porção restante» do nucleolo, de maiores dimensões, piriforme ou de fórma irregular e ás vezes de contornos denteados, cora-se fraca e diffusamente em uma bella tonalidade azul da Prussia (figs. 50 e 51). Em outros nucleos nota-se apenas tumefacção do nucleolo em cujas bordas, ás vezes em dois ou tres pontos distinctos, apparecem os componentes chromophilos em azul quasi negro (figs. 70 e 71).

b) *marginacção de componentes nucleolares:*

Os dois componentes nucleolares gradualmente se separam (fig. 51) dirigindo-se a porção mais intensamente chromophila para a membrana sobre a qual vêm se incrustar distinguindo-se então apenas pelas suas maiores dimensões de granulos de chromatina que ahi tambem se encontram. A porção restante do nucleolo, em azul da Prussia, permanece na séde habitual do nucleolo.

Os mesmos aspectos podem ser verificados usando outros métodos de coloração. O método pelo carbol-methyl-grün-pyronin de Pappenheim-Unna tem a vantagem de mostrar que a porção componente nucleolar que designamos por componente chromophilo não parece ser constituído por basichromatina; com efeito, elle se cora em vermelho pelo método de Pappenheim-Unna, ao passo que a basichromatina se tingem em verde.

MORFOLOGIA DOS CORPUSCULOS INTRANUCLEARES NO HOMEM

O critério que adoptamos para a caracterisação dos corpusculos intranucleares no homem foi o seguinte: reconhecer como «corpusculos intranucleares específicos da febre amarella» unicamente as figuras typicas (figs. 62, 65 e 68) nas quaes «o reticulo de linina alterado é englobado por uma substancia acidophila mais ou menos abundante que se collecciona na porção central do nucleo; taes porções alteradas do nucleo são de todos os lados separadas da membrana nuclear por um halo claro; acompanhando taes aspectos typicos nota-se, sobre a membrana nuclear, nitida tumefacção da basichromatina ahi localisada.

Correspondem esses aspectos aos estadios typicos que descrevemos no macaco como «figuras em calota de esphera» e «em borboleta» (figs. 18 e 15).

Não levamos em conta, no material humano, estadios mais precoces da formação dos corpusculos intranucleares, por duas razões. A primeira foi a facilidade de confundir com esses estadios precoces, outras lesões nucleares não especificas, taes modificações da oxychromatina e de outras nucleoproteinas associadas a alterações degenerativas da cellula hepatica, bem como alterações do nucleolo.

A segunda foi que, em todos os *M. rhesus* inoculados com virus da febre amarella não encontramos um só no qual existissem apenas aquellas phases precoces com exclusão das phases typicas («figura de borboletas» «calota de esphera»).

Nas figuras 61, 62, 63, 64, 65, 68 e 69 indicamos o aspecto dos corpusculos intranucleares nos tres casos humanos de febre amarella em que os observamos. Um delles (Caso 5271) é uma menina de 4 annos de idade, removida de um fóco de febre amarella para o Hospital Oswaldo Cruz e que ahi veio a fallecer cerca de 40 horas após o inicio da molestia, segundo informações do seu medico assistente, o Dr. Evandro Chagas.

A autopsia foi iniciada 30 minutos após o obito.

Este foi o caso humano em que mais abundantes se mostraram os corpusculos intranucleares (figs. 63, 64 e 65). Podem ser encontrados em quasi todos os cortes de figado examinados, mas são antes escassos e de

modo algum comparaveis em abundancia á dos corpusculos intranucleares em cortes de figado de macacos infectados.

Uma particularidade que notamos varias vezes foi a de que, quando, depois de pesquisa, por vezes demorada, vem a se encontrar uma cellula hepatica com corpusculos intranucleares, nos campos visinhos, mas não nas cellulas immediatamente adjacentes, sempre é possível encontrar diversas outras cellulas com corpusculos intranucleares. Ha, assim, em cada corte, um foco ou uma pequena area onde estão acantonadas as cellulas com corpusculos intranucleares.

O segundo caso (Caso 2485) em que encontramos corpusculos intranucleares na cellula hepatica (figs. 61 e 62) foi um dos primeiros casos da epidemia de 1928. Trata-se de um soldado no qual a doença evoluiu, bastante rapidamente, em pouco mais de 48 horas, segundo informações fornecidas ao Dr. Caleb Bomfim que foi quem trouxe o material ao nosso laboratorio.

Ahi, tambem, as cellulas com corpusculos intranucleares podem ser encontradas em quasi todos os córtes, mas sempre esparsas e incomparavelmente mais raras que no macaco.

Alguns desses corpusculos dão a impressão de serem incompletamente desenvolvidos. Elles apresentam os caracteres geraes das alterações especificas: substancia acidophila na parte central do nucleo, independente do nucleolo e tumefacção da basichromatina na membrana. O seu stroma, porém, é mais facilmente identificavel ao reticula de linina do que nos corpusculos completamente desenvolvidos, onde tal reticulo soffre alterações mais ou menos accentuadas. Tambem o nucleoplasma, em torno da substancia acidophila conserva estructura proxima do normal (fig. 62) ao em vez de se apresentar como um halo aparentemente sem estrutura (Oc. 4×) como nos corpusculos bem desenvolvidos.

O terceiro caso (Caso 5396), (figs. 68 e 69) no qual encontramos corpusculos intranucleares especificos, era um rapaz de 19 annos, fallecido no 6º dia de molestia e cuja autopsia iniciamos 23 minutos após o obito.

Embora o aspecto não seja tão semelhante ao dos corpusculos intranucleares do macaco como os que vimos nos outros dois casos, offereceu as mesmas características geraes de taes corpusculos (fig. 68).

A pesquisa de inclusões typicas resultou negativa em 14 outros casos de febre amarella (quadro (VIII)). Não consideramos, porém, esse resultado ainda como definitivo. Com effeito, no Caso 5396, onde mais tarde viemos a encontrar corpusculos intranucleares, pesquisas anteriores haviam sido infructiferas. E' possível, assim, que em outros, tambem, elles

existam de modo muito escasso e venham a ser posteriormente encontrados por um acaso feliz.

Devemos informar que, de facto, em alguns dos 14 casos reunidos no quadro VIII, embora não existissem inclusões típicas, notamos muitas vezes augmento apreciavel de particulas acidophilas intranucleares (fig. 59), em relação aos casos humanos que examinamos como contraprova. Em taes casos nos sentimos embaraçados para negar que taes aspectos não tivessem relação com a degeneração oxychromatica. Achamos que é indispensavel um melhor conhecimento das phases iniciaes da degeneração oxychromatica antes de tirar qualquer conclusão em casos humanos de febre amarella com modificações accentuadas das nucleoproteinas acidophilas.

O que não resta duvida é que a amostra ou amostras de virus da febre amarella que ocorreram durante a epidemia de 1928 no Rio de Janeiro, eram fracas productoras de inclusões no homem, ao passo que no macaco foram capazes de determinar abundante producção de inclusões quando directamente inoculados com o sangue do doente no macaco (quadro I).

Certamente isso não vem em apoio da ideia segundo a qual as condições do virus são fundamentalmente identicas no homem e no macaco, questão essa sobre a qual voltaremos em outro lugar.

E' importante para o assumpto de que trata este capitulo, que sejam perfeitamente distinguidas entre si as alterações intranucleares especificas e não especificas. Por outras palavras, é indispensavel estabelecer quaes as alterações intranucleares que estão associadas a processos regressivos communs e que podem simular, mais de perto, as verdadeiras inclusões intranucleares.

Com esse fim, procuramos distinguir provisoriamente, dando-lhes uma designação arbitraria, todas as alterações que, a nosso juizo, eram sufficientemente típicas e pareciam ocorrer em circumstancias variadas com aspecto mais ou menos constante.

Inclusões intranucleares: As inclusões intranucleares típicas nos casos humanos estão localizadas á porção central do nucleo, sendo separadas da membrana nuclear por um espaço claro de nucleoplasma. A tumefacção da basichromatina sobre a membrana nuclear nunca é tão accentuada no homem (figs. 65 e 1) como nos macacos, especialmente os injectados com a amostra africana Asibi (fig. 31 e 34).

No nosso material, quer do homem, quer do macaco, as inclusões não são formadas «within the nucleus in colony-like masses of which the individual particles are about the size of most ricketsiae», conforme descrevem Cowdry e Kitchen no seu material.

No nosso material, as inclusões da febre amarella são formadas por uma «substancia fundamental» e por um «stroma» (figs. 71 e 69).

A substancia fundamental é uma nova substancia que se origina em virtude de processos anormaes decorrendo no nucleo. Ella é, provavelmente, formada por diversas nucleoproteinas acidophilas relacionadas em parte com a oxychromatina, mas em parte provavelmente com outras nucleoproteinas derivadas do nucleoplasma.

Em phases iniciaes as nucleoproteinas acidophilas acima mencionadas ficam localizadas apenas em algumas malhas do reticulo de linina. Examinadas então com o augmento de 600—1000 diametros em um campo microscopico fortemente illuminado, as substancias acidophilas tornam-se mais conspicuas do que o reticulo e assumem o falso aspecto de granulos (fig. 68). O exame com augmento mais forte usando a luz branca da «Speziallampe» Nitra de Leitz, e varias aberturas do diaphragma-iris, permite observar dentro da inclusão um stroma que corresponde ao reticulo de linina do nucleoplasma alterado (fig. 69).

Nas condições opticas mencionadas, o «stroma» se mostra formado por um reticulo e por particulas basophilas ou granulos incrustados no reticulo.

Esses granulos de forma irregular e de dimensões sensivelmente uniformes correspondem a particulas de basichromatina levemente tumefactas, as quaes soffrem lyse e por conseguinte, são fracamente coradas pelo hemalun (fig. 69).

Os amphinucleolos são, em regra geral, facilmente diferenciaveis, quer topographicamente, quer pelas reacções de coloração das inclusões, conforme haviamos notado nos macacos (Torres, 1928 c, 1928 j). Em alguns casos existe um duplo nucleolo, mas ordinariamente, conforme notaram Cowdry e Kitchen, o nucleolo é relativamente bem conservado, ao passo que, no mesmo preparado, as alterações nucleolares são bastante pronunciadas em cellulas hepaticas que não apresentam inclusões.

Granulos erythrocytiformes: No nucleoplasma de uma cellula hepatica apparecem um ou dois granulos acidophilos, redondos, de contornos nitidos e intensamente corados pela eosina (figs. 57, 58 e 60). O reticulo de linina e a membrana nuclear, em taes cellulas, geralmente não mostram modificações do aspecto normal.

Algumas vezes a porção central do granulo acidophilo é mais pallidamente corada, contrastando com a periphéria: a apparencia de erythrocyto é, então, bem apreciavel (figs. 57 e 58).

Muitas vezes esses granulos peculiares existem dentro de «empty nuclei» junto da membrana nuclear e de remanescentes do reticulo de

linina (fig. 60), isso quer em casos de febre amarella, quer em outras doenças.

A forma redonda regular e os contornos nitidos que elles oferecem quando examinados com Obj. imm. 1/12 e Oc. periplan. 4× ou 8× de Leitz, tornam-se menos nitidos quando se os examina com a Oc. 12 ou 25 de Leitz e a luz da «Speziallampe» de Leitz. Em taes condições se verifica que o granulo erythrocytiforme é formado por uma substancia acidophila (oxychromatina ?) depositada em duas ou tres malhas do reticulo de linina. O forte contraste existente entre essas substancias intensamente coradas em roseo e as malhas do reticulo de linina explica o aspecto que comparamos ao de um erythrocyto que possui o granulo quando examinado com 800 a 1000 diametros em um campo microscopico fortemente illuminado.

Nunca se verifica tumefacção da basichromatina sobre a membrana nuclear neste typo de alteração nuclear, conforme acontece com as inclusões das doenças de virus (figs. 57, 58 e 60).

Particulas acidophilas: Numerosas particulas acidophilas, pequenas, irregulares, algumas vezes formando grupos distinctos (figs. 59 e 56) são algumas vezes encontradas no interior de nucleos de cellulas hepaticas, quer em casos de febre amarella (fig. 59), quer em outras doenças (fig. 56).

A distincção é, algumas vezes, delicada entre estas particulas acidophilas e os granulos erythrocytiformes. Quasi sempre, porém, as particulas acidophilas (oxychromatica ?) acompanham em certa extensão as malhas do reticulo de linina, apresentando assim, um contorno irregular e franjado. Tambem os seus contornos tornam-se muito pouco nitidos quando usados augmentos mais poderosos e manobrado o diaphragma-iris.

Basophilia do nucleoplasma: Não é raro observar em nucleos enrugados de cellulas hepaticas, quer na febre amarella, quer em outras doenças (fig. 55), uma coloração azul do nucleoplasma, algumas vezes apenas na visinhança dos nucleolos.

E' uma condição nuclear mais ou menos semelhante a que assignamos anteriormente nas cellulas hepaticas, de *rhesus* inoculados ou não inoculados (Torres, 1929 a, figs. 44 e 45).

Alguas vezes existe uma lyse apparente da basichromatina intranuclear em taes nucleos azues.

Multiplicidade do nucleolo: Na febre amarella, constitue uma alteração proeminente, a occurrencia de muitos nucleolos dentro de um mesmo nucleo (figs. 59 e 54). Taes nucleolos oferecem, de regra, grande variabilidade de dimensões, não sendo raro encontrar micronucleolos cujas

dimensões representam um quinto ou menos da de outros nucleolos no mesmo nucleo (figs. 59 e 54). Todos esses nucleolos mostram uma estrutura typica de micronucleolos em preparados corados pela phloxina e azul de toluidina.

No nucleo interkinetico da cellula hepatica ocorre, assim, uma reprodução ou multiplicação do nucleolo muito accentuada na febre amarella, mas occorrendo tambem em outras molestias (Quadros VIII e IX).

Em alguns casos, um micronucleolo fica de permeio com particulas acidophilas, de modo que, quando o campo microscopico é fortemente illuminado, elle parece corado, tambem, em roseo, o que se verifica não ser o caso quando se fecha o diaphragma e o campo é obscurecido. Isso verificamos na cellula desenhada na figura 59. Figuras intranucleares complexas podem, assim, dificultar o reconhecimento da degeneração oxychromatica na cellula hepatica, em casos humanos de febre amarella, quando os seus aspectos não são typicos.

Nucleos esvasiados: A figura 60 mostra nucleos esvasiados encontrados em caso humano de febre amarella. Elles são semelhantes ás estruturas descriptas como «empty nuclei» e representadas na figura 48 do trabalho de Cowdry e Kitchen (1930).

Tumefacção dos nucleolos: Foi encontrada quer na febre amarella, quer em outras doenças (Quadros VIII e IX). A's vezes, o nucleolo apresenta uma estreita margem acidophila e o centro basophilo (fig. 53).

VIRUS DA FEBRE AMARELLA E INCLUSÕES INTRANUCLEARES

Sendo o agente etiologico da febre amarella um virus filtravel e ultramicroscopico, é impossivel affirmar ou negar, em uma base morphologica, se elle toma parte na formação dos corpusculos nucleares especificos e está nelles incluído. Isso, aliás, não foi nem poderá ser feito para nenhum dos corpusculos cuja especificidade é geralmente admittida, taes os de Negri, de Guarnieri e de Bollinger.

Com effeito, usando o microscopico actual, uma particula com as dimensões de 0.2 está nos limites da visão clara, «for resolution depends on $1/2 n. a.$ which, using white light and the best lenses, is about 0.2». (Martin). Os limites physico e optico previstos pela theoria estão quasi attingidos (Bernard). No emtanto, experiencias de filtração através de membranas de collodion levam á supposição de que o diametro das particulas dos virus filtraveis seja approximadamente a da molecula da proteina ($2-3 \mu\mu$); contudo outras indicam uma magnitude igual ou maior que as particulas do «collargol», ou seja $20 \mu\mu$ (Martin).

Por conseguinte, o problema das relações entre virus filtraveis e as

inclusões cellulares especificas que os caracterizam só poderá ser abordado de modo indirecto e é isso o que procuraremos fazer accumulando dados que a elle digam respeito.

Estão neste caso os que estabelecem uma relação entre a presença do virus da febre amarella no sangue e nos tecidos demonstrada por inoculação em animaes sensiveis e pelas lesões typicas da febre amarella experimental e a existencia dos corpusculos nucleares especificos na cellula hepatica.

Os quadros annexos informam do que apuramos no material do Instituto Oswaldo Cruz de que pudemos dispor.

Conforme mostram os quadros, o resultado da inoculação em animal sensivel só é indicado em certo numero delles, ou porque para a conclusão das experiencias em que serviram os animaes fosse bastante a verificação anatomo-pathologica da febre amarella experimental ou porque não tenhamos colhido as necessarias informações junto aos collegas já mencionados os quaes bondosamente nos forneceram o material. A infecção do macaco, nos casos em que não foi feita inoculação a outro macaco, é garantida pela occurrencia de lesões typicas de febre amarella experimental, especialmente as do figado.

O que chama, em primeiro logar, a attenção, é a frequencia com que os corpusculos especificos apparecem nos macacos inoculados.

Assim, elles são encontrados, sem excepção, em 6 animaes inoculados com sangue retirado no decurso das primeiras 72 horas de molestia, de doentes de febre amarella da epidemia no Rio de Janeiro, em 1928 (v. Quadro I).

Elles apparecem em tres, dentre quatro macacos que foram picados por *Aedes aegypti* quer infectados em doente de febre amarella, quer em *M. rhesus* inoculados com amostras ou africana «Asibi» (v. Quadro II). O macaco em cujas cellulas hepaticas não ha inclusões, não se infectara, conforme mostraram o exame histologico e a inoculação em outro macaco.

Ao passo que os corpusculos nucleares especificos são presentes em todos os 12 animaes (v. Quadro IV) inoculados com sangue de macacos infectados pela amostra africana «Asibi», existem, apenas, em 4, dentre 8 inoculados com sangue de macacos infectados pelas amostras brasileiras (v. Quadro III). Tambem dentre 14 macacos (v. Quadro V) inoculados com emulsão de figado virulento (amostra brasileira), elles existem em 7, ao passo que são encontrados em todos os dez animaes (v. Quadro VI) inoculados com emulsão de figado virulento (amostra africana «Asibi»). Esses factos estão de accordo com as differenças de virulencia e irregula-

ridade de acção notadas nas amostras americanas (Aragão, Cunha e Muniz, Davis, Monteiro) quando comparadas com a amostra africana «Asibi».

Dentre 15 animaes inoculados com emulsão e excreta de *Aedes aegypti* infectados, os corpusculos nucleares especificos existiam em 12 (v. Quadro VII).

Sendo os corpusculos nucleares especificos possivelmente associados á presença do virus no interior das cellulas affectadas, offerece interesse verificar que relações apresentam elles com a evolução da molestia experimental.

O exame dos quadros annexos mostra que os corpusculos nucleares especificos não foram encontrados em um animal inoculado com sangue virulento (amostra brasileira) de outro macaco e morto no 3º dia (v. Quadro III), nem em outro inoculado com emulsão de mosquitos infectados (amostra brasileira F. W.) e morto no 3º dia (v. Quadro VII). Ao contrario, elles eram presentes e mesmo abundantes, em 3 macacos (v. Quadro VI) inoculados com emulsão de figado virulento (amostra africana «Asibi»).

Em macacos inoculados com amostra brasileira, os corpusculos nucleares especificos são abundantes em um animal infectado com sangue de doente e morto no 5º dia (v. Quadro I), existindo, mas não em abundancia, em outro animal picado por mosquitos e morto no 5º dia (v. Quadro II).

Assim, de inicio, é patente que a virulencia da amostra de virus da febre amarella empregada tem influencia manifesta, sendo os corpusculos especificos encontrados em animaes mortos no 3º dia de inoculação quando inoculados com a amostra africana «Asibi», ao passo que só começam a apparecer no 5º dia de inoculação nos animaes inoculados com amostras brasileiras.

Os corpusculos especificos mostram-se geralmente presentes e algumas vezes abundantes, em *M. rhesus* infectados com amostras brasileiras e examinados entre o 6º e o 14º dias de molestia.

O exame do Quadro V suggere uma desaparição gradual dos corpusculos em animaes que sobrevivem á infecção. Esta interpretação encontra, porém, sem duvida, uma objecção na irregularidade de acção, atraz mencionada das amostras brasileiras; é que tal irregularidade poderá explicar, ella propria, os resultados colligidos no quadro acima mencionado.

O Quadro VII mostra que nos macacos inoculados com mosquitos infectados, especialmente com a amostra africana «Asibi» não são raros os casos de infecção prolongada, nos quaes os corpusculos nucleares es-

pecíficos ocorrem em animais examinados depois de 14, 17 e 21 dias de infecção. Também no Quadro V existe um macaco com molestia prolongada e corpusculos nucleares específicos no 36º dia de molestia, nos Quadros I e III, 2 macacos com corpusculos específicos no 15º dia, no Quadro IV um no 25º dia de molestia.

É possível que as inclusões na febre amarella estejam associadas á presença *in loco* de micro-organismos ultramicroscopicos. Mas ellas podem representar, sem duvida, unicamente a acção nociva occorrida pelo virus sobre a cellula hepatica. As inclusões seriam, assim, a consequencia tardia da acção nociva occasionada pelo virus. Sendo assim, ellas poderão existir na cellula, embora o virus não mais ahi se encontre, nem no sangue.

De qualquer maneira, a explicação mais simples, a nosso juizo, para a escassez das inclusões no homem e a sua abundancia no macaco está nas differenças que a distribuição do virus apresenta nas duas especies animaes.

É claro que, se as inclusões constituem uma alteração especifica nas cellulas hepaticas associada á infecção pelo virus da febre amarella, esteja presente em quantidade sufficiente e exerça a sua acção durante um periodo de tempo sufficiente.

É logico que quanto maior for a quantidade de virus e maior o prazo de tempo durante o qual elle exerce a sua acção nociva, tanto mais intenso será o seu effeito nocivo.

Serão absolutamente identicas as condições relativas á presença do virus da febre amarella no macaco e no homem ?

Seguramente não: a infecciosidade do sangue e dos tecidos diminue e mesmo, de regra, desaparece, inteiramente, no doente de febre amarella após o terceiro dia de molestia: menos virus no sangue e nos tecidos, menor numero de inclusões nas cellulas do figado.

No macaco, ao contrario, as experiencias de transmissão da molestia são relativamente facéis de se conseguir em prazo de tempo distinctamente maior que no homem: maior quantidade de virus no sangue e nos tecidos ou então virus agindo durante maior prazo de tempo, mais numerosas as inclusões nas cellulas do figado.

O resultado do estudo do material humano que examinamos concorda com os de Cowdry e Kitchen, sendo desfavoraveis á hypothese segundo a qual as inclusões significariam a presença actual do virus da febre amarella na cellula hepatica.

Na verdade encontramos as inclusões, embora escassas, em um doente que morreu no sexto dia de molestia (Quadro VIII).

QUADRO I

Macacos inoculados com sangue de doentes de febre amarella ¹ retirado durante as primeiras 72 horas.

N. do animal injectado	Duração da molestia experimental	Resultado da inoculação em animal sensível (<i>M. rhesus</i>)	Inclusões intranucleares typicos na cellula hepatica	Observações
<i>M. rhesus</i> 8 Ar. ₂	5 dias		Presentes; abundantes	O animal teve morte espontanea. O doente era um caso benigno. A autopsia mostrou lesões typicas de febre amarella nos cortes histologicos de figado.
<i>M. cynomolgus</i> 7 Ar.	7 dias		Presentes	O animal teve morte espontanea. Os cortes histologicos de figado mostram lesões typicas de febre amarella.
<i>M. rhesus</i> 478 Ar.	8 dias	Positivo	Presentes	Inoculação com 8 cc. de sangue de um caso suspeito, o animal teve morte espontanea. Lesões histologicas typicas de febre amarella no figado.
<i>M. rhesus</i> 37 Ar.	9 dias		Presentes; não abundantes	O animal teve morte espontanea. O doente era um caso grave. Lesões histologicas de febre amarella no figado e rins.
<i>M. rhesus</i> 6 C. Mn. ₃	11 dias	Positivo	Presentes	O animal teve morte espontanea. O doente era um caso benigno. A amostra isolada ficou sendo a F. W.
<i>M. rhesus</i> 9 Art.	15 dias		Presentes; raras	Inoculado com sangue de dois casos benignos.

¹ — Epidemia de 1928, no Rio de Janeiro, Brasil.

² — Material devido á gentileza do Dr. H. de Beaurepaire Aragão.

³ — Material devido á gentileza dos Drs. A. Marques da Cunha e J. Muniz.

QUADRO II

Macacus rhesus picados por *Aedes aegypti* infectados

N. do animal infectado	Duração da molestia experimental	Resultado da inoculação em animal sensível (<i>M. rhesus</i>)	Inclusões intranucleares typicos na cellula hepatica	Observações
<i>M. rhesus</i> 35 Ar.	5 dias		Presentes	O animal teve morte espontanea. Os mosquitos foram infectados em um doente de febre amarella. A autopsia mostra lesões histologicas de febre amarella.
<i>M. rhesus</i> 226 Ar.	6 dias		Presentes	Sacrificado em agonia. A autopsia mostra lesões histologicas typicas de febre amarella no figado e rins.
<i>M. rhesus</i> 32 C. Mn.	8 dias	Negativo	Ausentes	Foi picado por 2 <i>Aedes aegypti</i> que sugaram o <i>rhesus</i> 25 (virus brasileiro F. W.), os quaes aparentemente não se infectaram. Os cortes de figado do 32 C. M. não mostram as lesões de febre amarella experimental.
<i>M. rhesus</i> 400 Ar.	8 dias		Presentes	Sacrificado. Os mosquitos estavam infectados com virus africano <i>Asibi</i> . A autopsia mostra lesões typicas de febre amarella no figado.

QUADRO III

Animas inoculados com sangue virulento (virus brasileiro) de outros macacos

N. do animal injectado	Duração da molestia experimental	Resultado da inoculação em animal sensível (<i>M. rhesus</i>)	Inclusões intranucleares typicos na cellula hepatica	Observações
<i>M. rhesus</i> 28 Ar.	3 dias		Ausentes	Morto precocemente de peritonite. Os cortes histologicos de figado não mostram as lesões de febre amarella.
<i>M. rhesus</i> 98 Ar.	6 dias	Negativo	Ausentes	Apresentou febre nos primeiros dias. Parecendo que ia sobreviver, foi sacrificado. A autopsia mostrou bronchopneumonia do pulmão direito, petechias na pleura, degenerescencia gordurosa do figado, pleurite fibrosa chronica direita. Lesões de febre amarella experimental ausentes.
<i>M. rhesus</i> 16 C. Mn.	6 dias	Positivo	Presentes; abundantes	Amostra F. W. de virus. Sacrificado após queda de temperatura. Os cortes de figado mostram lesões de febre amarella experimental.
<i>M. rhesus</i> 100 Ar.	10 dias	Negativo	Presentes	Inoculado com soro de <i>rhesus</i> infectado conservado na geladeira de um dia para outro. Apresentou curva thermica irregular sendo sacrificado.
<i>M. rhesus</i> 76 Ar.	10 dias	Negativo	Presentes; abundantes	Inoculado com 0 cc. 2 de soro de <i>M. cynomolgus</i> infectado. Sacrificado.
<i>M. rhesus</i> 78 Ar.	10 dias		Presentes; discretas	Inoculado com sangue de <i>M. cynomolgus</i> 56 Ar. infectado. Sacrificado. Os cortes de figado mostram lesões typicas de febre amarella experimental.

<i>M. rhesus</i> 74 Ar.	12 dias	Ausentes	Inoculado com 1 cc. de sangue do <i>rhesus</i> 55 Ar., que fora injectado com virus, mas que sobreviveu, tendo apresentado oscillações de temperatura. O 74 Ar. apresentou, tambem, oscillações de temperatura, sendo sacrificado. A autopsia mostrou tuberculose chronica dos pulmões, figado e baço. Os cortes de figado não mostram as lesões da febre amarella experimental.
<i>M. cynomolgus</i> 15 C. Mn.	15 dias	Presentes; não abundantes	Amostra F. W. de virus. Morte expon-tanea. Os cortes de figado mostram lesões de febre amarella experimental.

QUADRO IV

Animaes inoculados com sangue virulento (virus africano, Asibi) de outros macacos

N. do animal infectado	Duração da molestia experimental	Resultado da inoculação em animal sensível (<i>M. rhesus</i>)	Inclusões intranucleares typicos na cellula hepatica	Observações
<i>M. rhesus</i> 457 Ar. Cl. 1	5 dias		Presentes; abundantes	Inoculado com emulsão de tres mosquitos suppostos infectados. Reinoculado com sangue virulento a 24/VI. Sacrificado a 29/VI. Os cortes de figado mostram lesões de febre amarella experimental.
<i>M. rhesus</i> 445 Ar.	5 dias		Presentes; não abundantes	Inoculado com sangue do <i>rhesus</i> 428. Morte expontanea.
<i>M. rhesus</i> 485 Ar. Cl.	5 dias		Presentes	Inoculado com 2 cc. de sangue do <i>rhesus</i> 478. Os cortes de figado mostram lesões de febre amarella experimental.
<i>M. rhesus</i> 489 Ar. Cl.	5 dias		Presentes; abundantes	Inoculado com 1 cc. de sangue do <i>rhesus</i> 479. Sacrificado. Os cortes de figado mostram lesões typicas de febre amarella experimental.
<i>M. rhesus</i> 443 Ar.	6 dias		Presentes	Inoculado com sangue do <i>rhesus</i> 427. Sacrificado. Os cortes de figado mostram lesões typicas de febre amarella experimental.
<i>M. rhesus</i> 476 Ar. Cl.	6 dias	Positivo	Presentes	Sacrificado. Os cortes de figado mostram lesões typicas de febre amarella experimental.
<i>M. rhesus</i> 480 Ar. Cl.	6 dias		Presentes	Inoculado com sangue do <i>rhesus</i> 476. Os cortes de figado mostram lesões typicas de febre amarella experimental.

<i>M. rhesus</i> 198 Ar.	7 dias	Positivo	Presentes; abundantes	Inoculado com 10 cc. de sangue secco e reservado no vacuo, vindo de Nova York, America do Norte. Sacrificado. A autopsia mostra lesões microscopicas typicas de febre amarella no figado e rins.
<i>M. rhesus</i> 444 Ar.	8 dias		Presentes; abundantes	Inoculado com sangue do <i>rhesus</i> 429. Sacrificado. Lesões hepaticas da febre amarella experimental.
<i>M. rhesus</i> 455 Ar. Cl.	10 dias		Presentes	Sacrificado. Lesões hepaticas da febre amarella experimental.
<i>M. rhesus</i> 467 Ar.	12 dias		Presentes	Inoculado com sangue do <i>rhesus</i> 449. Morte espontanea.
<i>M. rhesus</i> 434 Ar. Cl.	25 dias		Presentes	Inoculado a 26/V/929 com excreta de 6 mosquitos infectados ha cinco dias. Reinoculado a 13/VI com sangue virulento. Sacrificado a 8/VII.

¹ — Material obtido por gentileza dos Drs. H. de Beaurepaire Aragão e A. da Costa Lima.

Macacos inoculados com emulsão de fígado virulento (diversas amostras brasileiras do vírus da febre amarella).

N. do animal injectado	Duração da molestia experimental	Resultado da inoculação em animal sensível (<i>M. rhesus</i>)	Inclusões intranucleares typicos na cellula hepatica	Observações
<i>M. rhesus</i> 21 C. Mn.	5 dias		Presentes; raras	Inoculado com fígado do <i>rhesus</i> 17 (amostra F. W.). Morte expontanea.
<i>M. rhesus</i> 19 C. Mn.	5 dias	Positivo	Ausentes	Inoculado com fígado do <i>rhesus</i> 16 (amostra F. W.). Sacrificado.
<i>M. rhesus</i> 22 C. Mn.	5 dias		Presentes; não abundantes	Inoculado com fígado do <i>rhesus</i> 19 (amostra F. W.). Sacrificado.
<i>M. rhesus</i> 14 C. Mn.	6 dias	Positivo	Presentes; não abundantes	Inoculado com fígado do <i>rhesus</i> 8 (amostra F. W.). Abcesso na parede do abdomen. Sacrificado.
<i>M. rhesus</i> 17 C. Mn.	6 dias	Positivo	Presentes; não abundantes	Inoculado com fígado do <i>rhesus</i> 14 (amostra F. W.). Morte expontanea.
<i>M. rhesus</i> 8 C. Mn.	8 dias	Positivo	Presentes; não abundantes	Inoculado com fígado do <i>rhesus</i> 6 (amostra F. W.). Sacrificado.
<i>M. rhesus</i> 28 C. Mn.	9 dias		Ausentes	Apresentou febre. Tornando-se normal a temperatura foi sacrificado. Inoculado com fígado do <i>rhesus</i> 25 (amostra F. W.).
<i>M. rhesus</i> 23 C. Mn.	10 dias		Presentes	Inoculado com fígado do <i>rhesus</i> 17 (amostra F. W.). Morte expontanea.
<i>M. rhesus</i> 120 Ar.	11 dias		Ausentes	Apresentou elevações thermicas irregulares. Sacrificado.

<i>M. rhesus</i> 36 C. Mn.	12 dias	Ausentes	Inoculado com figado do <i>rhesus</i> 32 (amostra F. W.). O <i>rhesus</i> 32 foi picado por 2 mosquitos aparentemente não infectados.
<i>M. rhesus</i> 9 C. Mn.	18 dias	Ausentes	Injectado com filtrado de emulsão de figado de um <i>rhesus</i> inoculado com virus (amostra F. W.) e morto de septicemia.
<i>M. rhesus</i> 116 Ar.	19 dias	Ausentes	Apresentou curva thermica irregular. Sacrificado. A autopsia mostra numerosos nodulos parasitarios no apice de ambos os pulmões.
<i>M. rhesus</i> 60 Ar.	28 dias	Ausentes	Inoculado com 1 cc. de emulsão de figado do <i>rhesus</i> 9 Ar. (quadro I). Exemplar adulto femea, muito emmagrecido, pesando 2100 grs. A autopsia mostra numerosos nodulos parasitarios nos pulmões e intestinos, raros no figado.
<i>M. rhesus</i> 20 C. Mn.	36 dias	Presentes	Inoculado com emulsão de figado e soro inactivado (aquecido) de um mesmo macaco (<i>rhesus</i> 17 amostra F. W.). Morte expontanea.

QUADRO VI

Macacos inoculados com emulsão de fígado virulento (virus africano Asibi).

N. do animal infectado	Duração da molestia experimental ;	Resultado da inoculação em animal sensível (<i>M. rhesus</i>)	Inclusões intranucleares typicos da cellula hepatica	Observações
<i>M. rhesus</i> 56 C. Mn.	3 dias		Presentes; não abundantes	Inoculado com soro de convalescente e virus. Morte expontanea.
<i>M. rhesus</i> 57 C. Mn.	3 dias	Positivo	Presentes; abundantes	Inoculado com emulsão de fígado recentemente extrahido do <i>rhesus</i> 53. Sacrificado quando apresentava 40°9C. de temperatura.
<i>M. rhesus</i> 58 C. Mn.	3 dias	Positivo	Presentes; abundantes	Inoculado com emulsão de fígado do <i>rhesus</i> 57, recentemente extrahido. Morte expontanea.
<i>M. rhesus</i> 51 C. Mn.	4 dias	Positivo	Presentes; abundantes	Inoculado com emulsão de fígado do <i>rhesus</i> 207 Ar. recentemente retirado do animal. Morte expontanea.
<i>M. rhesus</i> 52 C. Mn.	4 dias		Presentes; abundantes	Inoculado com emulsão de fígado do <i>rhesus</i> 207 Ar. recentemente extrahido. Sacrificado.
<i>M. rhesus</i> 55 C. Mn.	5 dias		Presentes; abundantes	Inoculado com emulsão de fígado do <i>rhesus</i> 51 conservado durante um dia na geladeira. Morte expontanea.
<i>M. rhesus</i> 54 C. Mn.	6 dias		Presentes	Inoculado com emulsão de fígado do <i>rhesus</i> 51 e igual quantidade de soro (aquecido e 55°C.) do <i>rhesus</i> 50. Morte expontanea.

<i>M. rhesus</i> 204 Ar.	7 dias	Presentes; não abundantes	Inoculado com 2 cc. de soro de um indivíduo que se suspeitava ter tido febre amarella e, no dia seguinte, com 1 cc. de emulsão de figado do <i>rhesus</i> 198 Ar. Morte expontanea.
<i>M. rhesus</i> 50 C. Mn.	7 dias	Presentes	Inoculado com emulsão de figado; o órgão foi guardado na geladeira durante sete dias. Morte expontanea.
<i>M. rhesus</i> 62 C. Mn.	7 dias	Presentes; abundantes	Inoculado com emulsão de figado do <i>rhesus</i> 58, tendo sido o órgão guardado na geladeira durante quatro dias. Sacrificado em agonia.

QUADRO VII

Macacos inoculados com emulsão ou com excreta de Aedes aegypti infectados.

N. do animal injectado	Duração da molestia experimental	Resultado da inoculação em animal sensível (<i>M. rhesus</i>)	Inclusões nucleares typicos na cellula hepatica	Observações
<i>M. rhesus</i> 24 C. Mn.	3 dias		Ausentes	Inoculado com emulsão de mosquitos infectados (virus brasileiro F. W.). Morte expontanea.
<i>M. rhesus</i> 24 C. Mn.	4 dias		Ausentes	Inoculado com emulsão de mosquitos infectados no <i>rhesus</i> 32 (virus brasileiro F. W.). Sacrificado em agonia.
<i>M. rhesus</i> 412 Ar.	5 dias		Presentes	Inoculado com emulsão de mosquitos machos infectados (virus africano Asibi).
<i>M. rhesus</i> 273 Ar.	7 dias		Presentes	Inoculado com emulsão de cinco mosquitos infectados (virus africano Asibi). Morte expontanea.
<i>M. rhesus</i> 482 Ar.	7 dias		Presentes	Inoculado com emulsão de dois mosquitos machos infectados (virus africano Asibi). Morte expontanea.
<i>M. rhesus</i> 428 Ar.	9 dias	Positivo	Presentes; abundantes	Infectado com excreta de mosquitos contaminados depositado sobre a pelle (virus africano Asibi).
<i>M. rhesus</i> 479 Ar. Cl.	9 dias	Positivo	Presentes	Infectado com excreta de dois mosquitos contaminados (virus africano Asibi). Morte expontanea.
<i>M. rhesus</i> 19 Ar.	10 dias		Ausentes	Inoculado com mosquitos infectados cinco dias antes em um caso grave de febre amarella. Sacrificado.

<i>M. rhesus</i> Ar. Tx. ¹	10 dias	Positivo	Presentes; abundantes	Inoculado com emulsão de cinco mosquitos infectados (virus brasileiro). Sacrificado.
<i>M. rhesus</i> 483 Ar.	10 dias		Presentes	Inoculado com emulsão de quatro mosquitos infectados. Sacrificado.
<i>M. rhesus</i> 459 Ar. Cl.	12 dias		Presentes	Inoculado com emulsão de mosquitos infectados (virus africano Asibi). Sacrificado.
<i>M. rhesus</i> 429 Ar. Cl.	14 dias	Positivo	Presentes	Inoculado com pernas trituradas de mosquitos infectados (virus africano Asibi). Morte espontanea.
<i>M. rhesus</i> 449 Ar.	14 dias	Positivo	Presentes; abundantes	Infectado com excreta de mosquitos depositado sobre a pelle (virus africano Asibi).
<i>M. rhesus</i> 456 Ar.	17 dias		Presentes	Inoculado com excreta de dois mosquitos infectados (virus africano Asibi). a 8/VI. Reinoculado a 24/VI, a tarde. Morte na manhã de 25/VI.
<i>M. rhesus</i> 464 Ar. Cl.	21 dias		Presentes	Inoculado com emulsão de mosquitos machos infectados (virus africano Asibi) a 10/VI. Amanheceu morto a 1/VII. A autopsia mostra lesões typicas de febre amarella experimental no figado.

¹ — Material devido á gentileza dos Drs. H. de Beaurepaire Aragão e José Teixeira.

QUADRO VIII
 Alterações nucleares da célula hepática na febre amarela.

Caso N.	Sexo	Edade	Raça e nacionalidade	Período da molestia em que se deu o obito	Tempo decorrido entre a hora da morte e início da autopsia	Inclusões intra-nucleares na célula hepática	Granulos erythrocytiformes	Partículas acidophilas	"Empty nuclei"	Basophilia do nucleo-plasma	Tumefacção do nucleolo	Multiplicidade do nucleolo
5271	feminino	4 annos	branca, brasileira	40 horas	30 minutos	Presentes e typicos; relativamente abundantes	presentes					presente
2485	masculino		brasileiro	cerca de 48 horas		presentes	presentes					presente
5400	masculino	26 annos	branco, portuguez	3o. dia	22 hs. 30 minutos	ausentes		presentes				presente
6005	masculino	19 annos	branco, portuguez	3o. dia	13 hs. 30 minutos	ausentes						
2484	masculino			4o. dia		ausentes		presentes			presente	presente
5403	masculino	38 annos	branco, portuguez	5o. dia	4 hs. 30 minutos	ausentes	presentes	presentes			presente	
5395	masculino	39 annos	branco, portuguez	5o. dia	6 hs. 30 minutos	ausentes	presentes	presentes				
2530	masculino	21 annos	branco	5o. dia	21 horas	ausentes	presentes	presentes	presentes			
5396	masculino	19 annos	branco, brasileiro	6o. dia	23 minutos	presentes; raros	present. abundantes		presentes			presente
5390	masculino	31 annos	branco, austriaco	7o. dia	5 horas	ausentes		presentes			presente	presente
5284	masculino	26 annos	branco, suiso	7o. dia	3 horas	ausentes	present. abundantes				presente	
4134	feminino	15 annos	branca	7o. dia		ausentes						
5407	masculino	22 annos	mulato, brasileiro	8o. dia	40 minutos	ausentes	presentes ás vezes 5 ou 6 em um mesmo nucleo	presentes			presente	presente
5406	masculino	22 annos	mulato, brasileiro	9o. dia	9 horas	ausentes		presentes		presente	presente	presente
5402	masculino	13 annos	mulato, brasileiro		12 horas	ausentes	presentes raros	presentes		presente	presente	presente
5397	masculino	40 annos	branco, portuguez		1 hora 10 minutos	ausentes	presentes raros	presentes	presentes		presente	presente

QUADRO IX

Alterações nucleares da célula hepática

N. de autopsia	Diagnostico anatomico	Corpusculos intranucleares das doenças do "kario vikon group"	Granulos erythrocytiformes	Particulas acidophilas	"Empty nuclei"	Vacuolos nucleares com material acidophilo	Basophillia do nucleo-plasma	Tumefacção do nucleolo	Multiplicidade do nucleolo
1826	Carcinoma do figado	ausentes		presentes		presentes		presente	presente
1827	Tuberculose	ausentes		presentes					
1837	Malaria	ausentes				presentes		presente	
1851	Pancreatite hemorrhagica	ausentes	presentes						
1960	Leptomeningite purulenta (meningococco)	ausentes					presente	presente	
2250	Nephrite chronica	ausentes							
2332	Febre typhoide	ausentes					presente		
2344	Endocardite verrucosa mitral	ausentes	presentes		presentes				
2425	Pancreatite hemorrhagica	ausentes	presentes	presentes	presentes				
2431	Malaria	ausentes		presentes				presente	
2445	Hepatite intersticial chronica	ausentes					presente		
2543	Cholangite e abcessos no figado	ausentes							
2544	Malaria	ausentes						presente	
2555	Endocardite aortica	ausentes		presentes				presente	
2558	Carcinoma da vericula biliar	ausentes		presentes				presente	
5004	Septicemia	ausentes	presentes						
5010	Hepatite intrsticial chronica	ausentes							
5011	Nephrite chronica	ausentes							
5018	Colite ulcerosa e anemia	ausentes				presentes		presente	
5023	Tuberculose	ausentes				presentes	presente		

Podemos compreender esse facto, admittindo que as inclusões intranucleares representam apenas uma necrose parcial do nucleo e constituem uma alteração que persiste mesmo depois de completo desaparecimento do agente nocivo. Se tal agente nocivo é um micro-organismo vivo ultramicroscopico, é mesmo mais provavel que a sua vida e reproducção sejam antes desfavorecidas do que estimuladas quando a meronecrose se apresenta já bem constituida.

INCLUSÕES NA FEBRE AMARELLA E NO HERPES

Haviamos notado, no nucleo das cellulas hepaticas de *M. rhesus* infectados pelo virus da febre amarella (amostras brasileiras e africana «Asibi» não só a independencia de séde e de reacções corantes entre o nucleolo e os corpusculos intranucleares especificos, como a persistencia do nucleolo até phases finaes da degeneração oxychromatica.

Assim, em desenhos em negro (Torres, 1928 b, figs. *d*, *e* e *h*, 1928 c, figs. *c*, e *e*, 1929 d, figs. *b*, *c*, *f*, *g*, *h*, *i*), e em uma estampa colorida (Torres, 1929 a), o nucleolo é frequentemente figurado ao lado da inclusão intranuclear. Na estampa colorida, de facto, todas as figuras o apresentam, mesmo as figs. *i*, *j* e *k*, as quaes «show the end stages of oxychromatic nuclear degeneration»; na fig. *h*, onde o nucleolo não é representado, o texto informa que «the plane of sectioning accounts probably for it».

Cowdry e Kitchen estudando cortes de figado montados lado a lado, quer de *M. rhesus* apresentando inclusões da febre amarella, quer de *Cebus hypoleucus* contendo inclusões do herpes, estabeleceram, por comparação directa, diferenças entre as duas especies de inclusões. Entre outras, citam discordancia nas reacções de coloração, na separação ou clivagem entre constituintes acidophilos e basophilos do nucleo, etc. Outra diferença é a maior uniformidade de «individual particles» na febre amarella do que no herpes. «The typical droplets of variable size and the amorphous masses seen in herpes, are almost never met with in yellow fever».

Concluindo de accordo com as suas observações, Cowdry e Kitchen escrevem:

«Though no microchemical difference could be detected the process of inclusion formation in herpes is radically different from that found in yellow fever. The inclusion arises in herpes, not as a regular individual spherical clumps composed of closely packed fine particles, but as a more or less even cloud-like deposits of acidophilic particles in the centers of the affected nuclei. The nucleoli,

moreover, do not persist in herpes as in yellow fever, but are destroyed, or else soon marginate with the rest of the basophilic chromatin on the nuclear membrane». (Cowdry and Kitchen, 1930).

A persistencia do nucleolo nas inclusões da febre amarella e o seu desaparecimento precoce nas do herpes, constituem um dos mais evidentes caracteres differenciaes entre as duas inclusões, segundo Cowdry e Kitchen.

A proposito devemos dizer que nunca, desde o inicio dos estudos, julgamos identicas as inclusões da febre amarella e as do herpes. Escrevemos em Setembro de 1928:

«Em um segundo grupo (de doenças de virus filtravejs), estão aquellas em que as inclusões se localisam exclusivamente no nucleo, taes, entre outras, o herpes simples, o herpes symptomatico, o virus III do coelho e a varicella... A verificação que acabamos de fazer leva a incluir a febre amarella no segundo grupo acima citado». (Torres, 1928g).

Rivers, Haagen e Muckenfuss (1929 a) conseguiram um methodo pelo qual tecidos receptiveis infectados e cultivados *in vitro* evidenciam de um modo regular as alterações intracellulares visiveis characteristics da infecção por determinados virus.

Enucleando o globo ocular do coelho, inoculando o virus da vaccina e do herpes por escarificação da cornea e em seguida excisando-a e transportando-a para o meio de cultura, aquelles autores conseguiram abundantes e typicos corpusculos de Guarnieri no cytoplasma das cellulas epitheliaes da cornea infectada com o virus da vaccina e numerosas inclusões acidophilas nos nucleos das cellulas lesadas pelo virus herpetico.

Como preliminar a uma possivel applicação do methodo de Rivers, Haagen e Muckenfuss á cultura do virus amarillico, escarificamos com vaccinostylo a cornea direita de cinco coelhos, nella depositando sôro recente de *Macacus rhesus* infectado pelo virus da febre amarella (amostra franceza) e sangrando no primeiro dia de febre. As palpebras do coelho foram impedidas de recobrirem o globo ocular durante cerca de cinco minutos após a inoculação.

Os coelhos foram sacrificados, respectivamente, dois no quarto dia, um no quinto, um no setimo e outro no decimo quinto dias que se seguiram á inoculação.

O globo ocular, ora intacto, ora perfurado, bem como fragmentos de figado, foram fixados no Zenker-acetico. A cornea posteriormente excisada, foi incluída em parafina e os seus córtes histologicos corados pela hematoxylina-eosina não mostraram corpusculos intranucleares da febre

amarella nas cellulas epitheliaes da cornea; tambem elles não existiam nas cellulas hepaticas.

Os pontos de escarificação, nos animaes do quarto dia, eram por vezes reconheciveis nos cortes histologicos pela hyperplasia das cellulas epitheliaes e espessamento local da cornea.

Com o mesmo material usado nas experiencias com os coelhos (sôro de *M. rhesus* recentemente colhido em um animal injectado com amostra «Franceza» e que estava no primeiro dia de febre) inoculamos dois *Pseudocebus azarae*, macaco que, segundo Aragão (1929 b) apresenta reacção febril quando contaminado pelo virus da febre amarella.

A inoculação foi feita por via intraperitoneal e por escarificação do globo ocular direito.

Um dos animaes morreu de peritonite no sexto dia de inoculação. O outro foi sacrificado no decimo primeiro dia.

Tambem a pesquisa de corpusculos intranucleares especificos foi negativa, quer nas cellulas epitheliaes da cornea, quer nas do figado.

Na verdade não encontramos no figado nem inclusões nucleares nem outras lesões que fizeram suspeitar de uma infecção do *Pseudocebus azarae* pelo virus amarillico.

E' evidente que os nossos resultados foram conseguidos em numero muito pequeno de animaes e possivelmente esses não foram sacrificados na occasião mais opportuna para a producção de inclusões no coelho e no macaco *Pseudocebus*.

Confirmados que sejam, estabelecerão um caracter biologico differencial entre os virus do herpes e os da febre amarella, a se juntar aos caracteres morphologicos estabelecidos por Cowdry e Kitchen.

DISCUSSÃO

Dissemos que as inclusões da febre amarella são formadas por uma substancia fundamental e por um stroma.

A substancia fundamental é uma nucleoproteina acidophila, aparentemente extranha, em grande extensão, ao nucleoplasma normal.

E' bem sabido que, de um modo geral, quando as cellulas soffrem necrose, algumas de suas albuminas constitutivas, seja no nucleo, ou seja no cytoplasma, tornam-se fortemente acidophilas.

O que é peculiar e caracteriza a degeneração oxychromatica na febre amarella, distinguindo-a da necrose commum, é que as estruturas acidophilas são formadas, no principio, apenas em alguns pontos do nucleoplasma, ao passo que outros permanecem inteiramente livres de es-

tracturas acidophilas. Estes ultimos formam o espaço claro ou halo caracteristico, que circumda as inclusões.

No que respeita ao stroma, elle é simplesmente o reticulo de linina aprisionado pela substancia fundamental e cujas alterações se reconhecem pela tumefacção, acidophilia e encarquilhamento do reticulo bem como pela lyse das particulas de basichromatina.

Uma differença notada entre as alterações do reticulo de linina na degeneração oxychromatica da febre amarella e as que elle apresenta em outros processos regressivos (necrose, necrobiose), é que só são attingidas e soffrem tumefacção, acidophilia e lyse, as porções do reticulo englobadas pela substancia fundamental. A porção restante do reticulo, que pode ser apreciada, embora em pequena quantidade, no espaço claro que circumda a inclusão, cora-se geralmente bem; as alterações que soffre em porção do reticulo de linina (dilaceração) são claramente menos intensas do que as da porção situada no interior das inclusões.

Em resumo, o stroma representa uma alteração local do reticulo de linina; as suas modificações, lyse, acidophilia, tumefacção são habitualmente encontradas em processos regressivos.

No que respeita ao nucleolo, elle é topographicamente distincto das inclusões até phase adiantada do processo.

Os factos citados suggerem que as inclusões da febre amarella representam simplesmente uma necrose circumscripta do nucleoplasma e do reticulo de linina; tal necrose interessa apenas alguns dos seus componentes, ao passo que outros se apresentam mais ou menos bem conservados.

Com effeito, ao passo que alterações mais ou menos accentuadas occorrem no nucleoplasma, a membrana nuclear apresenta apenas tumefacção, em muitos casos, ligeira, de sua basichromatina, e as alterações nucleolares não são, tambem, accentuadas nas phases precoces de formação das inclusões.

O estudo de preparados fixados e corados, por conseguinte, mostra que as alterações que sobrem no nucleo da cellula hepatica e dão logar á formação de inclusões da febre amarella, apresentam caracteres geraes, taes a tumefacção, lyse e acidophilia peculiares á necrose commum. Nos primeiros estadios, comtudo, taes lesões mais accentuadas e mais adiantadas em alguns componentes nucleares, ou melhor, em algumas porções de alguns componentes nucleares, ao passo que outras porções desses mesmos componentes e bem assim outros elementos do nucleo, não apresentam alterações de necrose.

Taes factos suggerem fortemente uma «necrose parcial do nucleo», queremos dizer, uma necrose que interessa, a principio, alguns constituintes do nucleo, ao passo que outros são mais ou menos conservados.

Que informações fornece, de outro lado, o estudo das inclusões da febre amarella em cellulas examinadas a fresco e coradas por corantes vitaes ?.

A proposito será util recordar a opinião de Langeron sobre as interpretações que o observador está autorizado a fazer, quando realisa o exame de cellulas em estado vivo e coradas por corantes vitaes :

«Les colorations vitales permettent de démontrer la réalité de l'existence de certaines inclusions cellulaires qui pourraient être prises pour des précipités colorés, autrement dit, pour des artifices de préparation. Cette existence réelle ne sera prouvée qu'autant que la coloration aura eu lieu sans que la vie de la cellule soit arrêtée... Il faut savoir en outre que, *parmi les inclusions cellulaires, tout ce qui se colore n'est pas vivant*: des pigments divers et des cadavres de bactéries se colorent souvent très intensément... La valeur des colorations vitales est très contestable et très contestée. Des techniciens de premier ordre, comme Galeotti, Lec, Mayer, arrivent à conclure que les résultats obtenus ne constituent pas de véritables colorations. Le colorant peut diffuser dans la cellule vivante, mais ne produit pas une véritable teinture. *Généralement le noyau, et particulièrement la chromatine, ne se colorent pas; si la coloration se produit, c'est que la cellule est morte*». ¹

Depois de ler o trecho acima transcripto, não se pode evitar a ideia de que a observação a fresco e coloração vital das inclusões intranucleares na febre amarella sejam antes favoraveis do que contrarias á existencia de uma necrose parcial do nucleo como explicação das chamadas inclusões intranucleares.

Senão vejamos pela transcrição parcial da cuidadosa descrição de Cowdry e Kitchen (1929 e 1930):

«That the inclusions are present as such in the living animal and do not in any sense represent the coagulating action of the fixative is shown by the ease with which we have been able to study them in liver cells quickly removed from a chloroformed animal and examined in physiological salt solution. The addition of a supravital stain is not even necessary, since the refractive index of the individual particles is sufficiently different from that of the surrounding nuclear substance to render them easily visible with both direct and oblique illumination...». «*The particles became tinged when a trace of eosin is added to the salt solution, and are colored more intensely than any other elements in the cell when a little phloxin red is applied in the same way. In such supravital preparations they may be studied with ease and the details of their morphology and to-*

¹ Os gryphos são nossos.

pography can be distinguished rather better than in fixed and stained preparations, particularly if a binocular microscope giving perspective is employed. It is readily seen by focusing up and down through entire nuclei that clumps of particles which in thin sections appear to be isolated, are, in reality, often in contact with one another. Frequently there is a central mass, from which clumps of particles stretch out like arms... No indications have been observed of independent motility or of multiplication by division, nor have we detected any increase in size of the particles through accretion or condensation of further materials on their surfaces. The uniformity in size of the particles is noteworthy. They do not grade down past the border line of visibility, nor are there any specially large ones».

«The intranuclear inclusions... can be stained supravitally by dissolving small amounts of various dyes in the salt solution in which the cells are to be examined. They are tinged with eosin, methylene blue, and neutral red *and are colored more intensely than any other elements in the cell*² when phloxin red is applied in this way».

«The solubilities of the inclusions can likewise be tested in the fresh state without the addition of any dye.

... After this dilution with the saline solution the effective concentration of acetic acid is only about 0.05 per cent. The inclusions are dissolved apparently the moment that the acetic acid gains access to them, not one by one but *en masse*. The nucleolus disappears a few second later...».

Alguns dos pormenores da descrição de Cowdry e Kitchen, taes «the uniformity in size of the particles is noteworthy» e «clumps of particles which in thin sections appear to be isolated, are in reality, often in contact with one another. Frequently there is a central mass, from which clumps of particles stretch out like arms...», singularmente se ajustam ás nossas verificações em preparados corados, a respeito de um «stroma» do corpusculo intranuclear, constituído pelo reticulo de linina com as particulas de basichromatina nelle incrustadas.

De outro lado, a notavel afinidade para a phloxin red, que apresenta a fresco a inclusão, em contraste com os outros elementos da cellula, é um argumento favoravel á necrose circumscripta do nucleo.

Em conclusão podemos dizer que muitos factos observados suggerem, e outros não contrariam, a asserção de que nas cellulas hepaticas de *M. rhesus* injectados com o virus da febre amarella e em cellulas hepatica, de casos humanos de febre amarella, ocorre uma necrose que, no começo e durante certo tempo, interessa apenas determinados componentes do nucleo ao passo que outros são, aparentemente, conservados. Seria, assim, uma necrose parcial do nucleo.

Como hypothese de trabalho admittiremos que nas doenças pro-

² Os gryphos são nossos.

duzidas por virus filtraveis e ultramicroscopicos nas quaes existem «inclusões cellulares» caracteristicas, ocorre um processo regressivo peculiar que designamos pelo termo de «meronecrose» (de *meros* — parte — necrose).

A «meronecrose» é uma necrose que não interessa nem apenas uma cellula isolada, nem isoladamente o nucleo ou o cytoplasma de uma cellula isolada, mas apenas determinados componentes, quer unicamente do nucleo (doenças do «karyo-oikon group» de Lipschütz), quer sómente do cytoplasma (doenças do grupo «cyto-oikon»), quer tanto do nucleo quanto do cytoplasma (doença do grupo «cyto-karyo-oikon»). A melhor característica da meronecrose é a seguinte: enquanto determinados componentes do nucleo ou do cytoplasma apresentam signaes de necrose em adiantada phase de evolução, outros componentes do mesmo nucleo ou cytoplasma são aparentemente poupados, pelo menos nos primeiros estadios.

A meronecrose traz á observação constituintes cellulares que de ordinario são inapparentes no interior da cellula e que, em sua maior parte, são derivados de componentes da propria cellula. Outra característica da meronecrose, distinguindo-a em cada doença, é a sua afinidade ou especificidade não só para determinada especie celular, mas ainda, do mesmo modo, para determinados componentes de cada uma dessas cellulas especificamente compromettidas. Taes componentes seriam, na febre amarella, o nucleoplasma, no herpes, o nucleoplasma e o nucleolo, na raiva, as neurofibrilas e o chondrioma, e assim por diante.

Acreditamos que a hypothese da «meronecrose» é afinal uma simples questão de palavras.

No entanto ella seria muito commoda para os pathologistas que assim comprehenderiam melhor as alterações especificas das doenças de virus como um caso especial de processos geraes com que estão familiarizados (processos regressivos), do que como «inclusões cellulares», corpusculos de natureza obscura ou chlamydozoarios.

Em nosologia a hypothese da «meronecrose» viria explicar porque doenças tão diversas, taes a raiva, a febre amarella e o herpes, pertencem a um mesmo grupo nosologico: a meronecrose não é um processo regressivo geral compromettendo indifferentemente numerozo grupo de cellulas; é, ao contrario e caracteristicamente um processo regressivo com elevada especificidade celular, interessando isoladamente ora a cellula nervosa, ora a hepatica, ora a epithelial de revestimento, dando logar, assim, a uma symptomatologia muito dissemelhante.

A hypothese da «meronecrose» tambem se accorda com a doutrina

etiologica mais aceita neste grupo de doenças: a que reconhece como agente causal um organismo vivo ultramicroscopico; a sua pronunciada especificidade cellular exemplificaria um histo e cytotropismo do agente causal.

Finalmente, é ainda curioso que ella singularmente se accorde com um importante detalhe da biologia dos virus ultramicroscopicos, a saber: aquelles que, até agora tem sido cultivados, só o foram em meios que continham cellulas vivas. Este ultimo ponto de modo algum discorda da hypothese segundo a qual, apresentando cytotropismo mais ou menos estreito, taes micro-organismos só conseguem crescimento e multiplicação em meios artificiaes, quando localizados em determinados componentes da cellula; o seu desenvolvimento se acompanha da «meronecrose» especifica («corpúsculos especificos», «inclusões cellulares», chlamydozoarios, etc.).

Interessantes pesquisas de Rivers, Haagen e Muckenfurs (1929 *a* e *b*), vem em apoio do que acima dissemos. Esses autores, tendo conseguido a cultura dos virus da vaccina e do herpes em fragmentos excisados da cornea do coelho, empregam como criterio para decidir os seus resultados, a presença da meronecrose especifica («inclusões cellulares») da vaccina e do herpes. Estabelecem, assim, que a cultura de taes virus está regularmente associada á formação de inclusões caracteristicas nas cellulas vivas do meio de cultura.

A meronecrose seria um apanagio exclusivo das doenças de virus filtravel em virtude do modo de acção especial desses agentes infectuosos. Os processos communs de necrose e necrobiose são occasionados, na maior parte das vezes, por causas agindo do exterior sobre a cellula, quaes sejam causas toxicas (toxinas), alterações circulatorias (anemia local, congestão) influenciando o metabolismo cellular. Isso explicaria o aspecto geral que ellas apresentam em grande numero de circumstancias.

No caso das doenças de virus filtraveis, ao contrario, a meronecrose estaria ligada á acção directa de um agente infectuoso *in loco* dentro da cellula, e ainda mais, em determinadas zonas da cellula; estas seriam o cytoplasma, na raiva, o cytoplasma e o nucleo, na vaccina, exclusivamente o nucleo, na febre amarella e no herpes.

RESUMO

1—No interior do nucleo de cellulas hepaticas de *Macacus rhesus* e *M. cynomolgus* (figs. 13—34) inoculado com o virus da febre amarella e de cellulas hepaticas de doentes de febre amarella (figs. 61-65 e 68-69) ocorre o processo regressivo referido na litteratura sob o nome de «de-

generação oxychromatica». Tal processo apresenta grande intensidade nos macacos, sendo, porém, assaz escasso no material humano colhido em autopsias.

Esta alteração está intimamente associada ao efeito nocivo causado pelo proprio virus da febre amarella, sendo, nesse sentido, a unica alteração verdadeiramente especifica na febre amarella.

Não foram encontradas alterações do cytoplasma nem granulos intracellulares que tivessem relação com o virus da febre amarella.

Assim sendo, a febre amarella pertencerá ao grupo de doenças de virus filtraveis produzindo alterações cellulares caracteristicas ou corpusculos especificos, exclusivamente limitados ao nucleo. Deve ser incluída, portanto no grupo karyo-oikon da classificação de Lipschütz, juntamente com o herpes, varicella, virus III do coelho, «submaxillary disease», etc.

Como acontece em geral, nas doenças de virus filtraveis, formando inclusões intracellulares, observa-se na febre amarella que a inclusão celular especifica predomina ou existe exclusivamente em determinada especie celular. Até agora, no nosso material só conseguimos evidenciar a degeneração oxychromatica da febre amarella na cellula hepatica. Quando existe, porém, a sua abundancia é notavel, não raro atingido a quasi totalidade das cellulas hepaticas nos cortes histologicos examinados. Esse facto não pode ser observado nos casos humanos que examinamos, provavelmente em virtude de condições proprias do virus no homem e da phase da molestia na qual foi retirado o material para estudo.

Nas cellulas da camada cortical das suprarenaes de *M. rhesus* infectados encontramos aspectos nucleares suggestivos de degeneração oxychromatica (figs. 37 e 40); são escassos e de caracterisação duvidosa em virtude da concomitancia de alterações necrobioticas não especificas.

2—Durante a epidemia de febre amarella em 1928 no Rio de Janeiro, notamos differenças assaz pronunciadas entre as lesões hepaticas no homem e no *M. rhesus*.

Taes differenças, existindo em material assaz homogeneo quanto ás amostras de virus em questão, nos levam a concluir que a capacidade de formar corpusculos intranucleares especificos, como tambem a já conhecida permanencia do virus no sangue e nos tecidos, depende, de modo evidente, da especie animal usada e não da propria amostra empregada, nem do numero de passagens que ella soffreu no macaco.

Embora os doentes pertencessem a raças differentes (quadro VIII) e embora, possivelmente diversas amostras de virus tenham sido nelles inoculadas, estamos autorizados a concluir que a amostra ou amostras que

infectaram o homem na epidemia de 1928, no Rio de Janeiro, possuem nelle uma fraca capacidade de determinar inclusões intranucleares.

Ao contrario, a mesma amostra ou amostras são capazes de produzir no *M. rhesus*, logo na primeira passagem, inclusões intranucleares assaz abundantes.

Outra differença que notamos e attribuimos a especie animal empregada foi: as alterações hepaticas de natureza toxica e circulatoria (congestão, necrose e necrobiose da cellula hepatica) são nitidamente mais intensas no homem que nos macacos injectados com as amostras brasileiras do virus da febre amarella isoladas durante a epidemia de 1928 no Rio de Janeiro.

Conseguimos, no homem, evidencia de inclusões typicas na cellula hepatica, apenas em tres casos dentre dezeseite examinados.

Esse resultado, provavelmente, ainda não é definitivo, indicando, apenas a raridade extrema que os corpusculos podem apresentar nos casos de febre amarella que ordinariamente chegam á autopsia.

Tambem não realisamos uma pesquisa exhaustiva dos corpusculos em outros órgãos além do figado.

O caso no qual encontramos em maior abundancia os corpusculos intranucleares, offerecia duas circumstancias que isoladamente, e, com maior razão, associadas, não são habituaes em material de autopsia de febre amarella, a saber: trata-se de uma creança fallecida cerca de 40 horas após o inicio da molestia e a autopsia foi iniciada 30 minutos após o obito.

Notamos que, quando em uma preparação é encontrada uma cellula hepatica com inclusão, o exame não tarda em demonstrar, em campos microscopicos visinhos, uma ou outra cellula tambem com inclusão, ao passo que em pontos mais distantes nenhuma cellula é encontrada apresentando inclusões. Esses «fócos» de cellulas com inclusões nem sempre são faceis de encontrar, o que está de accôrdo com as differenças topographicas de outras lesões hepaticas, referidas por Oskar Klotz (1928) e Hudson (1928).

3—A degeneração oxychromatica é um processo regressivo nuclear, no qual tomam parte predominante elementos presentes no nucleo normal de cellulas tratadas pelos fixadores habituaes.

São elles: a oxychromatina, o reticulo de linina e as particulas de basichromatina neste ultimo incrustadas; de mistura e associadas á oxychromatina existem provavelmente outras albuminas nucleares acidophilas oriundas do nucleoplasma em condições pathologicas do nucleo.

Apenas esses elementos se apresentam alterados, quer quantitativa-

mente, quer em seu aspecto e disposição reciproca, quer em suas affinidades tinctoriaes.

O facto importante a reter é que taes modificações regressivas interessam, no inicio, unicamente determinadas partes componentes do nucleo com exclusão de outras e reproduzem nas cellulas hepaticas de animaes infectados, de maneira constante e regular, aspectos nucleares absolutamente typicos e especificos da infecção pelo virus amarillico.

4—O corpusculo intranuclear da febre amarella, em phases typicas (figs. 69 e 71) mostra-se constituido por uma «substancia fundamental» e por um «stroma».

A substancia fundamental é uma albumina nuclear basica, em parte formada pela oxychromatina ou lanthanina, em parte por outras nucleoproteinas oriundas do nucleoplasma. E' ella a porção componente que confere ao corpusculo accentuada acidophilia, e portanto aquella a que se reporta a designação usual de «acidophilic intranuclear inclusion».

Apresenta-se condensada na porção central do nucleo, sendo separada da membrana nuclear por um typico halo claro de nucleoplasma.

O «stroma» é formado pelo reticulo de linina e particulas de basichromatina, estruturas essas que occupam a zona central do nucleo onde se acha condensada a substancia fundamental. O reticulo de linina é tumefacto e menos nitido que no normal; as particulas da basichromatina, de dimensões pequenas mas notavelmente uniformes, coram-se umas ainda bem pelos corantes basicos, ao passo que outras soffrem *lyse*. O stroma é melhor apreciado nos preparados pelo bordo-hemalaun de Meyer, porque ahi a substancia fundamental é menos intensamente corada que que pela phloxin red.

Os detalhes precedentes são nitidos quando os corpusculos intranucleares são examinados com Oc. 25 × e Obj. imm. 100 × de Leitz usando como illuminação a luz branca de uma «Speziallampe Leitz» de baixa tensão «Nitra» (6 volts, 6 amp.); a variação de intensidade luminosa que permite tal aparelho de illuminação e o manejo do diaphragma-iris muito facilitam a observação de taes detalhes de difficil apreciação.

Tambem, adoptando as referidas condições de exame, percebe-se que o halo claro de nucleoplasma que circumda o corpusculo e o separa da membrana nuclear, não é desprovido de estructura. Quasi sempre é possivel ahi reconhecer restos do reticulo de linina; estes geralmente conservam a afinidade normal para os corantes, e assim se distinguem do «stroma» do corpusculo.

O exame cuidadoso mostra que esses restos do reticulo de um

lado se inserem sobre a membrana nuclear e do outro lado se continuam com o «stroma» do corpusculo intranuclear em um ou outro ponto.

Nos nucleos que soffreram a degeneração oxychromatica, é caracteristico um notavel augmento de volume da basicromatina situada junto á membrana nuclear. Contrariando a ideia geralmente acceita de que esse augmento de volume seja devido a uma «aposição» ou «marginção» de basicromatina, isto é, a um fusionamento de basicromatina oriunda de outras porções do nucleo com a da membrana nuclear, interpretamos esse augmento de volume como uma «tumefacção local» da basicromatina situada junto á membrana nuclear. Uma tumefacção de basicromatina com aspecto semelhante é referida por Pianese (1896) nas cellulas de tumores (Taf. IV, fig. IV).

5—A apparencia de «granulos acidophilos» que apresentam os corpusculos intranucleares quando examinados com Oc. 4× ou 12× Leitz e Obj. imm. 100×, quer com a luz natural, quer com lampada «Nitra», é um aspecto até certo ponto falso. Elle é corrigido pelo exame com Oc. 25×, Obj. imm. 100× e lampada «Nitra», empregando intensidade luminosa variavel da lampada e aberturas differentes do diaphragma-iris.

Sempre que assim procedemos no nosso material, quer nos corpusculos intranucleares da cellula hepatica do macaco, quer nos do homem, notamos que os «granulos acidophilos» das phases iniciaes da degeneração oxychromatica, correspondiam a uma substancia acidophila, cuja intensidade de coloração variava de ponto para ponto, cujos contornos eram difficeis de precisar e cuja fórmula nunca era espherica ou redonda. Tal substancia occupa uma ou diversas malhas do *reticulo de linina alterado* ou «stroma» do corpusculo, o que explica a sua fórmula caprichosa.

O aspecto de «granulos acidophilos» apparente ao exame com Oc. 4× e Obj. imm. 100× Leitz e luz natural ou artificial é provavelmente devido á grande luminosidade que em taes circumstancias possui a substancia acidophila (depositada nas malhas do reticulo de linina alterado ou «stroma» do corpusculo), quando comparada e fazendo contraste com o referido reticulo de linina.

Examinados com Oc. 25× e Obj. imm. 100× Leitz e lampada «Nitra» nas condições atraz referidas, os corpusculos intranucleares especificos da febre amarella revelam, na verdade, aspecto granuloso.

Mas os granulos que ahi se encontram não são acidophilos e sim basophilos, correspondendo traço por traço ás finas particulas de basicromatina que normalmente se acham incrustadas no reticulo de linina. Taes granulos, que «apresentam notavel uniformidade de dimensões, embora de fórmula irregular» são, por conseguinte, apenas um dos componentes do «stroma» do corpusculo.

Em resumo: examinados os corpusculos com augmento de 2000 — 2500 diametros deixam de existir os «granulos acidophilos» que o exame com 500—1000 diametros fazia suppor como partes constitutivas do corpusculo.

Com o mesmo augmento de 2000 — 2500 diametros o corpusculo mostra um aspecto granuloso; os granulos são, porém, basophilos, e correspondem a particulas de basichromatina que fazem parte do «stroma» do corpusculo; taes granulos basophilos podem ser igualmente e com facilidade apreciados com o augmento de 500—1000 diametros e luz natural, em preparados corados simplesmente pelo hemalaun de Meyer, ou pelo bordo-hemalaun.

6—As cellulas hepaticas de casos humanos de febre amarella mostram pronunciadas alterações da oxychromatina e de nucleoproteínas acidophilas, além das inclusões intranucleares (Quadro VIII).

Em uma tentativa para estabelecer distincções entre taes alterações que se prestam a confusão com a degeneração oxychromatica, estabelecemos designações provisórias para todos os aspectos nucleares anormaes que, a nosso criterio, se apresentassem com maior constancia e parecessem representar um typo de alteração definido. Distinguimos, assim, «granulos erythrocytiformes», «particulas acidophilas», etc.

Ao passo que em vinte casos de autopsia (Quadro IX) usados como contraprova, os granulos erythrocytiformes eram presentes em seis, as particulas acidophilas (oxychromatina ?) (fig. 56) em cinco, e a multiplicidade de nucleolos apenas em um, em dezeseite casos de febre amarella, os granulos erythrocytiformes (figs. 57, 58 e 60), existiam em dez, as particulas acidophilas (fig. 59) em dez, e a multiplicidade de nucleolos (figs. 54 e 51) em dez.

BIBLIOGRAPHIA

- ARAGÃO, H. de B. 1929 a—Modernas aquisições sobre a febre amarella experimental. *Archivos de Hygiene* 3, 5.
- ARAGÃO, H. de B. 1929 b—Febre amarella experimental no Brasil. *Brasil Medico*, 43, 849.
- BARNARD, J. E. 1930—Ina discussion on «Ultramicroscopic viruses». *Proc. Roy. Soc., Series B*, 104, 537.
- COWDRY, E. V. 1928—Intracellular pathology in virus diseases in *Filtrable Viruses*; edited by T. M. Rivers. Baltimore.
- COWDRY and KITCHEN, S. F. 1929—Intranuclear inclusions in yellow fever. *Science*, 69, 252.
- COWDRY and KITCHEN, S. F. 1930—Intranuclear inclusions in yellow fever. *The Amer. Jour. of Hyg.*, 11, 227.

- DAVIS, N. C. and BURKE, A. W. 1929—Studies on South American yellow fever virus. I. The origin of the strains in use at the Yellow Fever Laboratory in Bahia, Brasil. *Jour. Exp. Med.*, **49**, 975.
- DAVIS, N. C. and SHANNON, R. C. 1930—The location of yellow fever virus in infected mosquitoes and the possibility of hereditary transmission. *The Amer. Journ. of Hyg.*, **11**, 335.
- GOODPASTURE, E. W. 1925 a—Intranuclear inclusions in experimental herpetic lesions of rabbits. *Amer. Journ. of Path.*, **1**, 1.
- GOODPASTURE, E. W. 1925 b—A study of rabies, with reference to a neural transmission of the virus in rabbits, and the structure and significance of Negri bodies. *Amer. Journ. of Path.*, **1**, 547.
- HINDLE, E. 1929 a—An experimental study of yellow fever. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. and Hyg.*, March, **22**, 405.
- HINDLE, E. 1929 b—In a discussion in «Ultramicroscopic viruses». *Proc. Roy. Soc. Series B*, **104**, 537.
- HINDLE, E. and STEVENSON, A. C. 1929—Oxychromatic nuclear inclusions in yellow fever. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. and Hyg.*, June, **23**, 3.
- HOFFMANN, W. H. 1929 a—in Kolle, W., Kraus, R. u. Uhlenhuth, P.—*Hand. d. pathog. Mikroor.*, Bd. VIII, Lfg. 32.
- HOFFMANN, W. H. 1929 b—Einschlüsse in den Leberkernen beim menschlichen Gelbfieber. *Arch. f. Schiffs u. Tropen-Hyg.*, **33**, 411.
- HOFFMANN, W. H. 1930—On the nature of the inclusion bodies in yellow fever. *Medical Journal and Record*, March. 19.
- LANGERON, M. 1916—*Précis de microscopie* Masson & Cie., Paris.
- MARTIN, C. 1929—In a discussion «Ultramicroscopic viruses». *Proc. Roy. Soc.*, Series B, **104**, 537.
- PENNA, O. e FIGUEIREDO, B. de 1929—Contribuição ao estudo da histopatologia do figado na febre amarella. *Folha Médica*.
- PETTIT, A. 1929—Virus amaril. *Biologia médicale*, **19**, 337.
- PIANESE, G. 1896—Beitrag zur Histologie und Aetiologie des Carcinoms. *Beitr. z. path. Anat. u. z. allg. Pathol.*, Suppl. Hefte I.
- PRENANT, A., BOUIN, P. et MAILLARD, L. 1904—*Traité d'Histologie*, Tome I. Paris.
- RIVERS, T. M., HAAGEN, E. and MUCKENFUSS, R. S.—1929 a—A method of studying virus infection and virus immunity in tissue cultures. *Proc. of the Soc. of Exper. Biol., and Med.*, **26**, 494.
- RIVERS, T. M., HAAGEN, E. and MUCKENFUSS, R. S. 1929 b—Development in tissue cultures of the intra-cellular changes characteristic of vaccinal and herpetic infections. *Jour. of exper. Med.*, **50**, 665.
- ROCHA LIMA, H. da—1912.—Zur pathologischen Anatomie des Gelbfiebers. *Verh. d. deut. path. Ges.*, **15**, 163.
- ROCHA LIMA, H. da 1929—Sobre a anatomia pathologica da febre amarella. *Folia clinica et biologica*, **1**, 4.
- SAWYER, W. A., LLOYD, W. D. M., and KITCHEN, S. F. 1929—The preservation of yellow fever virus. *Jour. Exper. Med.*, **50**, 1.

- STOKES, A., BAUER, J. H. and HUDSON, N. P. 1928—Experimental transmission of yellow fever to laboratory animals. *Amer. Jour. Trop. Med.*, 8, 103.
- TREILER, M. 1930—Susceptibility of white mice to the virus of yellow fever. *Science*, 71, 367.
- TORRES, C. M. 1928 a—Inclusions nucléaires acidophiles (dégénérescence oxychromatique) dans le foie de *Macacus rhesus* inoculé avec le virus brésilien de la fièvre jaune. *C. R. Soc. Biol.*, 99, 1344 (Séance du 25 juillet de la Soc. brés. de Biol.).
- TORRES, C. M. 1928 b—Inclusions intranucléaires et nécrobiose chez *Macacus rhesus* inoculé avec le virus de la fièvre jaune. *C. R. Soc. Biol.*, 99, 1655 (Séances des 15 et 29 août, 14 et 26 septembre de la Soc. Brés. de Biol.).
- TORRES, C. M. 1928 c—Dégénérescence oxychromatique dans le foie de *Macacus rhesus* et *M. cynomolgus* accompagnant les lésions typiques de la fièvre jaune expérimentale; son absence dans le foie de Singes non inoculés. *Ibid.*, 1660.
- TORRES, C. M. 1928 d—Sur la dégénérescence oxychromatique du foie chez les Singes inoculés avec le virus de la fièvre jaune. *Ibid.*, 1669.
- TORRES, C. M. 1928 e—Sobre a «necrose salpicada» do figado na febre amarella. *Sciencia Medica*, nº 8, Agosto.
- TORRES, C. M. 1928 f—Sobre a degeneração oxychromatica da cellula hepatica como lesão característica na infecção experimental pelo virus brasileiro da febre amarella. *Brasil Medico*, nº 36, 8 de Setembro.
- TORRES, C. M. 1928 g—Inclusões nucleares acidophilas (degeneração oxychromatica) na febre amarella experimental. *Sciencia Medica*, 1928, nº 9, Setembro.
- TORRES, C. M. 1928 h—Sur l'importance de la dégénérescence oxychromatique des cellules du foie chez *Macacus rhesus* inoculé avec le virus Brésilien de la fièvre jaune. *C. R. Soc. Biol.*, 99, 1671 (Séances des 15 et 29 août, 14 et 26 septembre 1928 de la Soc. brés. de Biol.).
- TORRES, C. M. 1928 i—Alterações nucleares das cellulas do figado nas infecções de *Macacus rhesus* e *M. cynomolgus* pelo virus da febre amarella. *Mem. Inst. O. Cruz, Suppl.*, nº 2, 15 Outubro pg. 55.
- TORRES, C. M. 1928 j—Étude par le procédé de Goodpasture et la réaction de Feulgen, des inclusions nucléaires de la fièvre jaune expérimentale. *C. R. Soc. Biol.*, 100, 966 (Séance du 26 décembre de la Soc. brés. de Biol.).
- TORRES, C. M. 1929 a—Intranuclear inclusions in experimental yellow fever. *Mem. Inst. O. Cruz, Supp.*, nº 6, março, pg. 69.
- TORRES, C. M. 1929 b—Sur les inclusions nucléaires dans la fièvre jaune expérimentale (virus brésilien et africain). *S. R. Soc. Biol.*, 101, 951 (Séance du 27 mars, de la Soc. brés. de Biol.).
- TORRES, C. M. 1929 c—Inclusões nucleares na febre amarella. *Brasil-Medico*, 6 de Abril.

- TORRES, C. M. 1929 d—Altérations nucléaires des cellules du foie chez les Singes inocués avec le virus brésilien et africain de la fièvre jaune. C. R. Soc. Biol., 101, 959 (Séance du 24 avril de la Soc. Brésil. de Biol.).
- TORRES, C. M. 1929 e—Morphologie des inclusions hépatiques dans la fièvre jaune humaine. C. R. Soc. Biol., 102, 410 (Séance du 13 juin de la Soc. brés. de Biol.).
- TORRES, C. M. 1929 f—Altérations du nucléole des cellules du foie dans la fièvre jaune. *Ibid.*, 414 (Séance du 27 juin de la Soc. brés. de Biol.).
- UNN, P. G. 1928—Histochemie der Haut, 1928, F. Deuticke, Leipzig.

EXPLICAÇÃO DAS ESTAMPAS XXVIII—XXX

- As figuras 1 a 65 e a figura 68 foram desenhadas com Oc. comp. 6 e obj. imm. homog. 1/12 Zeiss, na altura da mesa, com luz natural.
- As figuras 66, 67 e 69 a 72, foram desenhadas com Periplan. Ok. 25B e Obj. imm. Apert. 1,30, 100x de Leitz, usando como aparelho de iluminação a «Speziallampe Nitra» de baixa tensão (6 volts, 6 amp.) de Leitz. A apreciação dos detalhes referidos com este ultimo augmento é facilitado pela variação na intensidade do fóco luminoso e manobras do diaphragma-iris.
- Nas figuras 1 a 8 e figs. 53, 64 e 67, a coloração foi feita pela fuchsina basica e azul de methyleno de Loeffler; nas figs. 9 a 11 e 63 foi usado o mesmo processo, sendo os córtes tratados, depois da coloração e deshydratação, pelo carbol-xylole-oleo de cravo.
- Nas figuras 12 a 37, 40 a 48, 52, 53, 55, 56, 57, 59, 60, 61; 62, 68, 69, 71 e 72 a coloração foi feita pela fuchsina basica e azul de methyleno de Loeffler; nas figs. 9 a 11 e 63 foi usado o mesmo processo, sendo os córtes tratados, depois da coloração e deshydratação, pelo carbol-xylole-oleo de cravo.
- Nas figuras 12 a 37, 40 a 48, 52, 53, 55, 56, 57, 59, 60, 61, 62; 68, 69, 71 72 a a coloração foi a hematoxylina Delafield ou o hemalaun de Meyer e a eosina. Na figura 49 a coloração foi a «Nuclealfärbung» de Feulgen. Nas figuras 50, 51, 66 e 70, a coloração foi feita pela phloxine e azul de toluidina. Nas figuras 38 e 65, a coloração foi o bordo e hemalaun.
- Na fig. 37 foi usada a coloração pelo verde de methyla-pyronina de Pappenheim-Unna.
- Todos os córtes provém de material fixado em liquido de Zenker, com excepção das figuras 57, 61 e 62, onde o fixador usado foi o formol simples.

ESTAMPA XXVIII

- Figs. 1 e 2—Cellulas hepaticas normaes de *Macacus rhesus* 2638 não injectado; chromatina e membrana nuclear em azul, nucleolo em vermelho, cytoplasma em roseo azulado.
- Figs. 3 a 11—Cellulas hepaticas de *M. rhesus* Ar. Tx. (Quadro VII) inoculado com virus da febre amarella (figs. 3, 4 e 5 representam phases iniciaes da

formação das inclusões. Fig. 6 mostra uma inclusão típica («figura em borboleta») corada em azul violeta; nucleolo em vermelho. Fig. 7 mostra uma inclusão típica («figura em calota de esfera») corada em azul violeta; nucleolo em vermelho. Nas figuras 5 e 6, o retículo de linina e as partículas de basicromatina nelle situadas são reconhecíveis no interior da inclusão. Nas figuras 6 e 7 a membrana nuclear é irregularmente espessada em virtude da tumefacção da basicromatina ahí localizada. Nas figuras 4 a 7, leve augmento de volume do nucleo. Figura 8, degeneração oxychromatica em phase adiantada de formação, corada em violeta avermelhado (tonalidade mal reproduzida na estampa) e separada da membrana nuclear pelo halo claro característico; sobre a membrana nuclear, partículas de basicromatina tumefactas, semelhando depositos irregulares. Figura 9, cellula hepatica aparentemente normal do *M. rhesus* Ar. Tx. (Quadro VII). Figuras 10 e 11, inclusões típicas (figuras em borboleta e em calota de esfera) no *M. rhesus* Ar. Tx. (Quadro VII). O nucleolo não é visto na figura 10, provavelmente, em virtude do plano do corte; em 11, o nucleolo é formado por um granulo marginal vermelho escuro e uma porção restante menos intensamente corada.

ESTAMPA XXIX

As figuras 13 a 25 representam inclusões em *rhesus* inoculados com amostras brasileiras de virus, e as figuras 26 a 34, inclusões em *rhesus* injectados com a amostra africana Asibi.

Fig. 12, cellula hepatica do *rhesus* nº 13 C. Mn. inoculado com cultura de virus em meio de Noguchi (muitas passagens) e morto no 48º dia; nucleolo excentrico, reticulo de linina e partículas de basicromatina bem reconhecíveis; no nucleoplasma não existe aparentemente oxychromatina.

Fig. 13, phase inicial de formação da inclusão no *rhesus* nº 8 Ar. (Quadro I); nella sobrevêm substancias acidophilas em dois pontos circumscriptos do nucleoplasma; o nucleolo, o reticulo de linina e a membrana nuclear, aparentemente integros.

Figuras 14 a 16 e 18 a 23, inclusões típicas no *rhesus*, Ar. Tx. (Quadro VII), macaco infectado por virus brasileiro transmittido por mosquitos; figuras em calota de esfera (15 e 16), em borboleta (18 e 20), tripartidas (19).

Nas figuras 15, 16, 18, 19 e 20, as partículas de basicromatina do reticulo de linina coram-se pela hematoxylina de modo nitido, quer no interior da inclusão, quer no halo claro que a circumda. Nas figuras 21, 22 e 23, as partículas de basicromatina não são mais bem apreciadas (com a ampliação usada, o que é attribuível á lyse parcial que apresentam; em 22, ellas apparecem, sendo algum tanto tumefactas.

Figuras 17, 24 e 25, *rhesus* nº 8 Ar. (Quadro I) injectado directamente com sangue de doente, mostrando nitida tumefacção da basicromatina na membrana nuclear; em 24 e 25, as zonas onde existe a referida tumefacção alternam com outras onde aparentemente houve lyse completa da basicromatina depositada na membrana.

As figuras 27, 28, 32 e 33 pertencem ao *rhesus* 62 C. Mn. (Quadro VI); as 29, 30, 31 e 34, ao *rhesus* 58 C. Mn. (Quadro VI); a 26, ao *rhesus* 57 C. Mn. (Quadro VI).

As figs. 35, 36 e 40 representam cellulas epitheliaes da camada cortical das supra-renaes do *M. cynomolgus* 15 C. Mn. (Quadro III). Figura 35, nucleo normal; figura 36, cellula em dois nucleos, um dos quaes em karyolyse; figura 40, nucleoproteinas acidophilas accumuladas em ponto determinado do nucleoplasma e suggerindo uma inclusão da febre amarella.

As figuras 37 e 41 representam cellulas epitheliaes da camada cortical das supra-renaes do *rhesus* 8 C. Mn. (Quadro V); figura 41, alteração nuclear não especifica (basophilia do nucleoplasma) semelhante á que se vê em cellulas hepaticas de *rhesus*, quer injectados (figuras 42 a 47), quer não injectados «and also in man» (figura 55). As figuras 42, 46 e 47 provém do *rhesus* 24 C. Mn. (Quadro VII), as 44 e 45, do 8 C. Mn. (Quadro V), e a 43 do *rhesus* Ar. Tx. (Quadro VII).

Figura 48 representa uma cellula hepatica do *rhesus* 2655 não inoculado, com o nucleo em pycnose.

Figura 49 representa uma cellula hepatica do *rhesus* Ar. Tx. (Quadro VII) corada pela «Nuclealfärbung» de Feulgen; a inclusão não se cora, mostrando esboçado um reticulo, onde existem granulos em azul da Prussia vistos indistinctamente; sobre a membrana, porções coradas em violeta (chromatina).

Figura 38 representa um aspecto difficil de interpretar encontrado no figado do *rhesus* 443 Ar. (Quadro IV): artificio de preparação ? «empty nuclei» ?

Figura 39 representa uma cellula hepatica do *rhesus* Ar. Tx. (Quadro VII); nucleolo vermelho, inclusão sem coloração.

Figuras 50 e 51 representam cellulas hepaticas do *rhesus* Ar. Tx. (Quadro VII); a separação das porções componentes do nucleo é evidente.

Figura 52 representa uma cellula hepatica do *rhesus* 14 C. Mn. (Quadro V) com acidophilia do nucleoplasma, mas sem formação de inclusões.

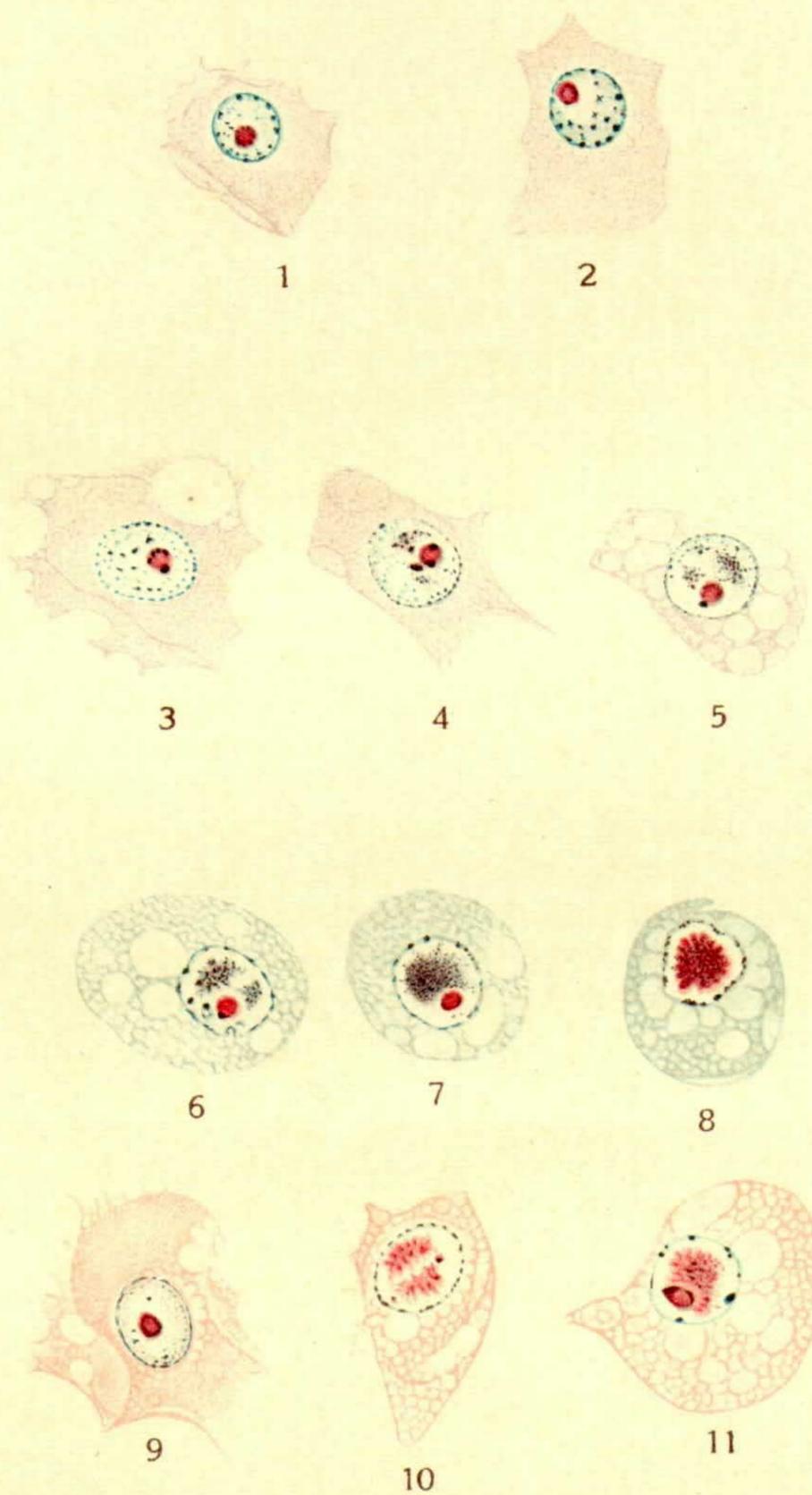
ESTAMPA XXX

Fig. 53 representa uma cellula hepatica com tumefacção do nucleolo em caso humano de febre amarella (caso 2488).

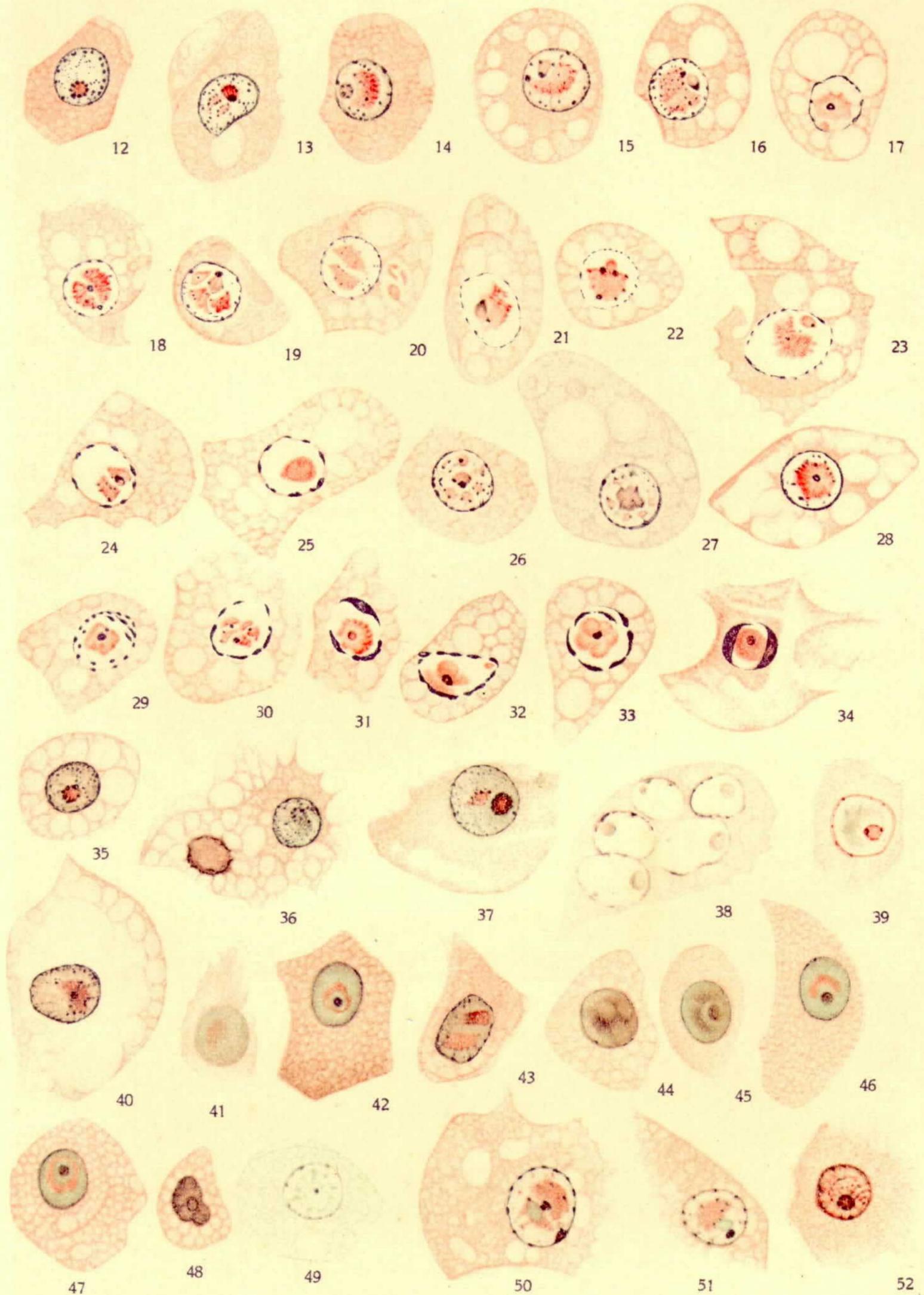
Figura 54 representa uma cellula hepatica com dois nucleos e multiplos nucleolos de tamanhos os mais variados, alguns micronucleolos com dimensões inferiores a 1/5 dos maiores; augmento de volume de um dos nucleolos (caso 5396).

Fig. 55 representa uma cellula hepatica com basiphilia do nucleoplasma em caso humano de febre amarella (caso 5406).

Fig. 56 representa uma cellula hepatica com alterações do nucleoplasma muito semelhantes ás inclusões nucleares das doenças de virus, encontrada em um caso de cancer da vesicula biliar (autopsia 2558); a conservação e integridade do reticulo de linina, a ausencia de tumefacção da basichromatina na membrana nuclear e do halo claro caracteristico em torno das porções acidophilas do nucleoplasma distinguem esse aspecto das inclusões especificas da febre amarella.

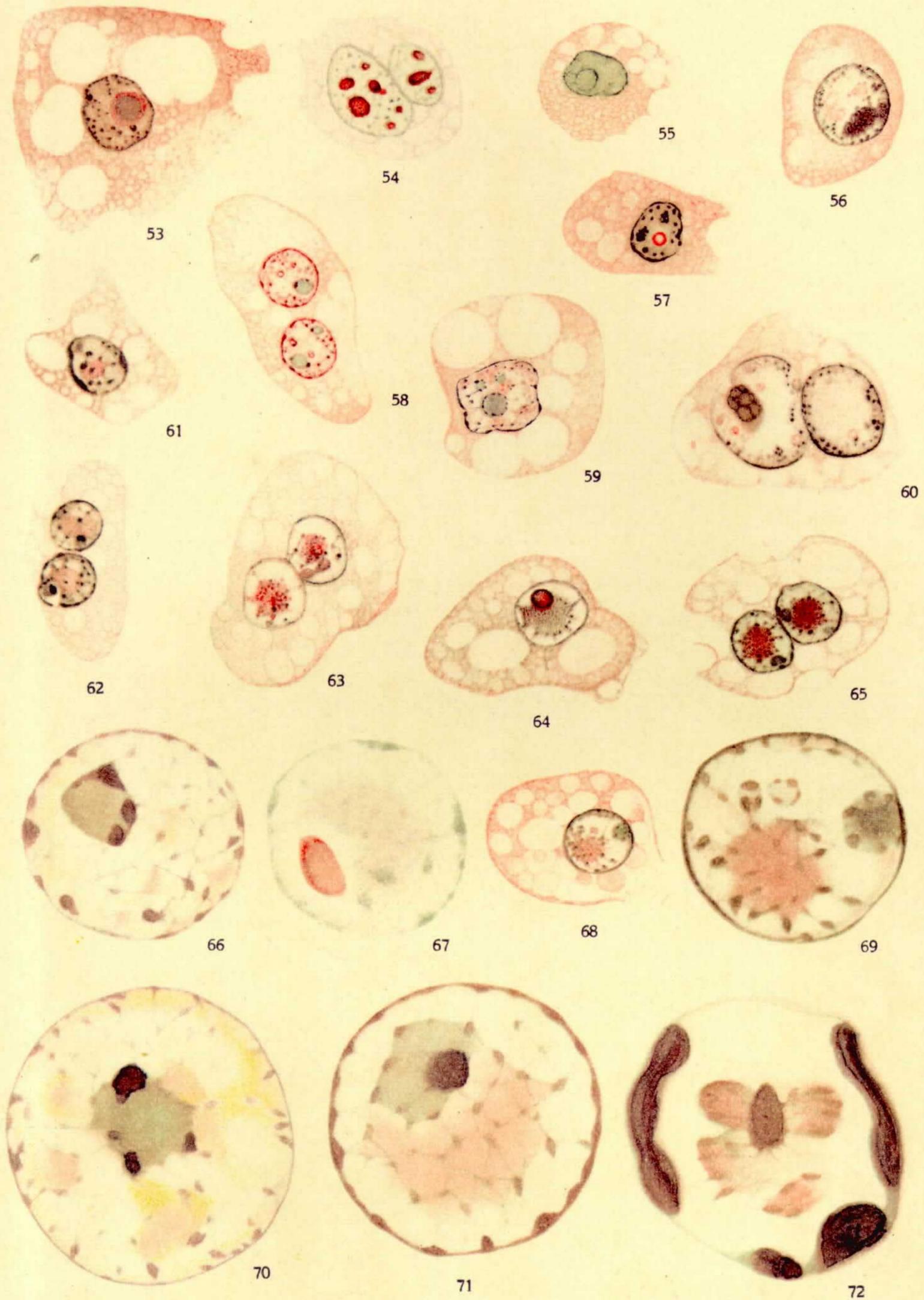


A Leal, del.



A. Leal, del.

Dr. C. Magarinos Torres : Degeneração oxychromatica na febre amarella.
Oxychromatic degeneration in yellow fever.



COM. LITH. YPRANGA - S. PAULO - RIO

A. Leal, del.

Dr. C. Magarinos Torres : Degeneração oychromatica na febre amarella.
Oychromatic degeneration in yellow fever.

- Figura 57 representa uma cellula hepatica de um caso de febre amarella (caso 2485) em cujo nucleo existe um granulo erythrocytiforme typico; o nucleolo não é reconhecivel no desenho.
- Na figura 58 são vistos dois granulos erythrocytiformes em cada um dos nucleos de uma cellula hepatica de um caso de febre amarella (caso 2530).
- Na figura 60, diversos granulos erythrocytiformes em «nucleos esvasiados» de uma cellula hepatica de caso humano de febre amarella (autopsia 5396).
- Figura 59 representa uma cellula hepatica de caso humano de febre amarella (caso 5397) com multiplicidade de nucleolos e alterações do nucleoplasma semelhante a inclusões.
- Figuras 61 e 62 representam inclusões typicas em cellulas hepaticas de um caso humano de febre amarella (autopsia 2485); figuras 63, 64 e 65, em outro caso (autopsia 5271) e figuras 68 e 69, em outro (autopsia 5396).
- A figura 69 representa o nucleo da cellula desenhada na figura 68, visto com maior ampliação; nella a inclusão é formada por uma substancia fundamental acidophila (oxychromatina e nucleoproteinas acidophilas formadas em condições anormaes ?) e por um stroma; este é o proprio reticulo de linina e as particulas de basichromatina nelle inclusas; estas soffrem lyse parcial.
- Figura 66 representa o nucleo de uma cellula hepatica aparentemente normal, no *rhesus* Ar. Tx. (Quadro VII); a oxychromatina existe em quantidade discreta.
- Figura 70 mostra o nucleo de uma cellula hepatica do *rhesus* Ar. Tx. (Quadro VII) em phase inicial de formação das inclusões; a albumina acidophila, corada de modo desigual em roseo e roseo-alaranjado, está alojada nas malhas do reticulo de linina, em 4 pontos separados entre si.
- Figura 71 mostra uma inclusão typica na cellula hepatica do *rhesus* Ar. Tx. (Quadro VII); a estructura do stroma é bem reconhecivel no interior da inclusão e bem apreciada a sua continuidade com o reticulo de linina no espaço claro que circumda a inclusão.
- Na figura 67 é tambem, aparente o stroma da inclusão em continuidade com o reticulo de linina bem conservado, fóra da inclusão; cellula hepatica do *rhesus* Ar. Tx. (Quadro VII).
- Fig. 72 mostra uma inclusão typica na cellula hepatica do *rhesus* 58 C. Mn. (Quadro VI) em phase adiantada de formação. Na inclusão nota-se a substancia fundamental mostrando variações no colorido roseo de um para outro ponto, e o stroma. O stroma é formado pelo reticulo de linina com malhas estreitas e deformadas, e particulas de basichromatina levemente tumefactas e em lyse. Pronunciada tumefacção da basichromatina na membrana nuclear.