

Estudo comparativo das inclusões do alastrim e da vacina no macaco (*Macacus rhesus*) (*)

pelos

DRS. C. MAGARINOS TORRES e J. DE CASTRO TEIXEIRA

(Com as estampas XXVIII–XXXI)

O alastrim, também denominado *amaas*, *Kaffir-milkpox*, *whitepox*, *mild smallpox*, *paravariola*, *parasmallpox*, *variola minor*, *variola mitigada* é uma doença infecciosa eruptiva específica semelhando a variola, sendo na opinião de alguns (LESCHKE, McSWEENEY) uma forma mitigada dessa doença, e na de outros (GARROW), molestia diversa, embora próxima daquela.

As informações encontradas na literatura a respeito das inclusões do alastrim são escassas, sendo que a sua própria existência é matéria controversa (v. RICARDO JORGE).

Embora a transmissão experimental do alastrim ao macaco seja relatada por vários pesquisadores e diversas espécies¹ usadas nessas experiências, nenhuma informação existe nesses trabalhos sobre a histologia das lesões experimentais conseguidas, sendo as primeiras a respeito desse assunto as que publicámos em 1933.

Semelhanças ou diferenças que fossem achadas entre os corpusculos de Guarnieri da variola e as inclusões do alastrim constituiriam dado importante para a questão das relações entre variola e alastrim.

Seria interessante explorar a questão sob esse ponto de vista, levando em conta que as inclusões das doenças de vírus são consideradas como alterações celulares delicadas e altamente específicas.

E' necessário, contudo, levar em conta que elas apresentam considerável variação em sua estrutura quando examinadas em tecidos e em animais diferentes. Assim as inclusões intranucleares da febre amarela, encontradas no cérebro de macacos injetados com a amostra do vírus da febre amarela adaptada ao camundongo, são por vezes semelhantes,

(*) Recebido para publicação a 5 de Dezembro de 1933.

¹ "Rhesus and bonnet monkeys" (Green 1915); *M. rhesus* (Leake and Force 1923); *M. rhesus* (Braxall 1923); "un Atele, Koata ou Koaita du Brésil" (Baujean 1925); "diverses espèces et variétés de cercopithèques" (Van Hoof 1925), "*Macacus cynomolgus*" (Leake and Force 1927).

mas, quasi sempre diferentes das inclusões típicas nas células hepáticas (GOODPASTURE).

Temos em vista, no presente trabalho, realizar um estudo comparativo da infecção experimental produzida em macacos *rhesus* pelo vírus do alastrim e da vacina. Uma atenção particular mereceu a morfologia das inclusões citoplasmáticas específicas estudadas comparativamente nos animais inoculados de um lado com alastrim e de outro com vacina. Os corpusculos do alastrim foram encontrados, por vezes em grande abundância, em biopsias de lesões cutâneas provenientes de 12 macacos *rhesus* diferentes e os corpusculos da vacina em lesões cutâneas de 3 outros macacos *rhesus*. Nestes últimos foram conseguidas vesículas e pustulas após injeção endovenosa de pólpa vacínica recentemente preparada (pólpa bruta).

O material empregado na transmissão experimental do alastrim provem de 3 doentes observados em uma pequena epidemia que ocorreu, em 1932, na cidade do Rio de Janeiro, de 4 outros durante uma epidemia, em 1933, no Estado de Minas Geraes, e de um outro, durante outra epidemia de alastrim no Estado do Rio de Janeiro, em 1933.

As condições indispensáveis para ser realizado um estudo comparativo entre as inclusões das doenças de vírus foram aparentemente preenchidas visto como foram elas examinadas em animais da mesma espécie e no mesmo tecido submetido aos mesmos artefactos de técnica: fixação no líquido de Helly, inclusão em parafina e coloração pela hematoxilina-eosina.

O presente trabalho aproveita material proveniente dos seguintes macacos:

Rhesus — 1469. O conteúdo de uma vesícula e duas pustulas de um doente de alastrim no 8.º dia de molestia (J. P. S., Hospital Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro) foi retirado por meio de três pipetas capilares estéreis e transportado, antes de secar, para um tubo de ensaio contendo 1,5 cc. de água fisiológica estéril. O líquido turvo assim obtido foi injetado por via endovenosa, alguns minutos após, no macaco 1469, não sendo praticada nenhuma escarificação prévia. O animal apresenta elevação de temperatura no 5.º dia e uma erupção no 6.º dia de inoculação. A erupção se inicia sob a forma de pequenas vesículas disseminadas sobre a face, extremidades inferiores, tronco e abdomen. As vesículas logo se transformam em pustulas, devendo-se notar que o estadio de papula é geralmente difícil de reconhecer no macaco. Novas vesículas aparecem, ainda, durante os dois dias seguintes. Foram retiradas por biopsia lesões da pele ao nível do tronco (n.º 3602), no 7.º dia, e ao nível do ante-braço (n.º 3618) e da coxa (n.º 3619), no 9.º dia. As condições gerais foram sempre boas, o animal sobrevivendo.

Rhesus — 1474. O conteúdo de diversas pustulas do *rhesus* 1469 no 7.º dia de inoculação foi colhido por meio de pipetas capilares e emulsionado em cerca de 1 cc. de água fisiológica. O líquido turvo assim obtido foi injetado por via endovenosa, alguns minutos após, no *rhesus* 1474, nenhuma escarificação tendo sido praticada na ocasião. O animal apresenta febre (41.º C.) no 4.º dia de inoculação e uma erupção no 8.º. Vesículas de tamanho variável, algumas volumosas, outras hemorrágicas, mas todas

sem umbelicação, aparecem na palma das mãos, sola dos pés e nas pernas. Fotografias dessas lesões foram já publicadas em uma nota anterior (v. C. R. Soc. Biol., 1933, pag. 917). Diversas biopsias de lesões cutâneas foram praticadas no 10.º e 12.º dias ao nível da face interna da perna esquerda (n.º 3632), pé direito (n.º 3638) e ante-braço (n.º 3639). O animal sobreviveu, permanecendo em boas condições.

Rhesus — 1484. Injetado por via endovenosa, tal como foi descrito na inoculação anterior, com o conteúdo de diversas pustulas do animal precedente (rhesus 1474) colhido no 10.º dia de inoculação. Apresenta uma elevação de temperatura (39,5º C.) no 5.º e uma erupção no 7.º dias, a qual é mais acentuada nas extremidades do que na face e tronco. Nos três dias imediatos aparecem novas vesículas que logo transformam-se em pustulas. Diversas biopsias foram praticadas no 8.º e 9.º dias ao nível da coxa esquerda (n.º 3663), da perna esquerda junto ao tornozelo e de ambos os pés (n.ºs 3664 e 3665). O animal sobrevive.

Rhesus — 1465. O conteúdo de varias pustulas de um caso de alastrim (P. S., Hospital S. Francisco de Assis, Rio de Janeiro) retirado com pipetas capilares esterilizadas foi emulsionado em agua fisiologica. Algumas horas depois, o material foi depositado na região interorbitaria do rhesus 1465 e nessa ocasião ahi praticadas com um bisturi diversas escoriações. Quatro dias após, a região se apresenta congesta e edemaciada, notando-se duas pequenas vesículas sobre as escarificações, as quais foram submetidas á biopsia (n.º 3593). O animal apresenta a temperatura de 39,5º C. no 6.º dia de inoculação, sobrevivendo e permanecendo depois em boas condições.

Rhesus — 1492. Uma emulsão preparada com o conteúdo de diversas vesículas e pustulas de um caso de alastrim (J. J. J., Hospital Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro), no 9.º dia de molestia foi injetado por via endovenosa no rhesus n.º 1492. O animal apresenta elevação de temperatura (39,6º C.) no 6.º dia de inoculação, e uma erupção sob a forma de pequenas vesículas sobre o pavilhão da orelha e outras, poucas, sobre o tronco. A erupção foi discreta e o exame histologico de uma lesão retirada no 9.º dia mostra a estrutura de uma pustula em dissecação. Não foram encontradas inclusões citoplasmaticas.

Rhesus — 1577. Injetado por via endovenosa, a 13 de Julho de 1933, com uma emulsão em agua fisiologica do conteúdo de pustulas de um caso de alastrim. O material foi retirado a 9 de Julho de 1933 em Caratinga, Estado de Minas Gerais, pelo Dr. Jairo Lobo Martins, ao qual agradecemos a gentileza de sua colaboração. O animal apresenta febre e uma erupção vesiculosa no 6.º dia de inoculação. Foram retiradas por biopsia duas vesículas da perna (n.ºs 3904 e 3905) O animal sobrevive.

Rhesus — 1593. Injetado por via endovenosa a 9 de Agosto de 1933 com 2 cc. de uma emulsão em agua fisiologica preparada com o conteúdo de pustulas de um caso de alastrim. O material foi colhido a 3 de Agosto de 1933 pelo Dr. Jairo Lobo Martins, em Caratinga, Estado de Minas Gerais. O macaco apresenta temperatura de 39.º C. no 5.º dia de inoculação e uma erupção vesiculosa predominante ao nível dos membros inferiores no 6.º dia. O animal sobrevive.

Rhesus — 1597. Recebeu por via endovenosa, a 12 de Setembro de 1933, 2 cc. de uma emulsão em agua fisiologica preparada com o conteúdo de diversas pustulas conservado em glicerina, de um caso de alastrim (G. P). O material foi colhido a 1 de Setembro de 1933, no Estado de Minas Gerais e obtido por gentileza do Dr. Ernani Agricola, Diretor de Saúde Publica Estadual. Nessa ocasião foram praticadas escoriações no dorso do animal cujos pêlos foram arancados. O macaco apresentou a temperatura de 39,8º C. no 5.º dia, a qual elevou-se a 40,1º no 6.º. No 4.º dia foram notadas diversas pustulas, mas nenhuma vesicula, na região escarificada do dorso. No 6.º dia surgem numerosas vesículas nas extremidades, especialmente nos pés, e ainda nas extremidades superiores, bem como algumas raras, na face. Foram retiradas diversas vesículas para estudo microscopico, três (nos. 3983-85) no 6.º e outras

(n.º 3998) no 9.º dia de inoculação. As vesículas achavam-se em franca dissecação no 17.º dia. O animal sobrevive, conservando-se em boa saúde.

Rhesus — 1605. Inoculado por via endovenosa com material retirado do macaco precedente (*rhesus* 1597) no 7.º dia de inoculação. Consta ele de duas vesículas recentemente excisadas e maceradas em água fisiológica. O animal mostra elevação de temperatura (39,8º C.) no 5.º dia. A febre persiste durante três dias, notando-se no 6.º dia o aparecimento de diversas pustulas e vesículas nas extremidades inferiores, outras, raras, na face e tronco. Novas vesículas surgem no 7.º dia sobre as pernas e pés. As lesões são assaz numerosas nos ante-braços e muito evidentes depois que os pêlos foram aparados com tesoura. Foram praticadas duas biosias (n.ºs 4017 e 4018). O animal sobrevive.

Rhesus — 1615. Inoculado por via endovenosa com material retirado do macaco precedente (*rhesus* 1605) no 8.º dia de inoculação. Consta de diversas pustulas recentemente excisadas e maceradas em água fisiológica. O animal apresenta elevação de temperatura (39,8º C.) no 5.º dia, caindo esta a 38,5º C. no 9.º dia. A erupção aparece no 6.º dia, sendo mais abundante nos membros inferiores, como em geral acontece. Novas vesículas surgem no 7.º e 8.º dias. Foram retiradas vesículas para estudo microscópico (n.ºs 4035, 4051, e 4052). O animal sobrevive.

Rhesus — 1602. Foi injetado por via intravenosa em 12 de Setembro de 1933 com 3 cc. de uma emulsão em água fisiológica do conteúdo de pustulas misturado com glicerina e material seco conservado em pipetas capilares, provenientes de um caso de alastrim (J. M.) ocorrido no Estado de Minas Gerais. O material foi devido á gentileza do Dr. Ernani Agrícola. O macaco apresenta a temperatura de 39,8º C. no 4.º dia, subindo ela a 40,4º C. no 7.º, caindo a 38,7º C. no 9.º e permanecendo em tórno de 38,3º C. nos dias imediatos. O animal sobrevive. A erupção se inicia no 6.º dia, sendo encontradas no 7.º numerosas vesículas, notadamente nas extremidades inferiores. No 8.º dia, numerosas vesículas aparecem nos ante-braços e algumas na face. A dissecação das lesões era acentuada no 12.º dia. Foram retiradas duas vesículas da coxa (n.ºs 3994 e 3995), no 8.º dia, para estudo histológico.

Rhesus — 4060. Injetado por via endovenosa com uma emulsão em água fisiológica preparada com o conteúdo de pustulas de um caso de alastrim no 10.º dia de molestia. O doente foi trazido de Itaperuna, Estado do Rio de Janeiro, onde grassava, então, uma epidemia de alastrim, para o Hospital Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. Foi isso possível graças á gentileza do Dr. Americo Oberlaender, Diretor da Saúde Pública Estadual. O animal apresenta febre no 6.º dia de inoculação, a qual persiste nos 3 dias imediatos, surgindo uma erupção vesicular no 6.º dia. Foi retirada uma vesícula para estudo histológico. O animal sobrevive.

Rhesus — 1629. Inoculado por via endovenosa com material retirado do macaco precedente (*rhesus* 4060), apresenta uma temperatura de 40,1º no 4.º dia. A febre persiste durante 3 dias, aparecendo no 5.º dia de inoculação algumas papulas nas extremidades inferiores e face. No 6.º dia, as vesículas são numerosas na face, pavilhão do orelha e extremidades inferiores. Novas vesículas surgem no 7.º dia. Foram praticadas duas biosias, uma (n.º 4076) no 8.º, e outra (n.º 4079) no 10.º dia de inoculação. O material consta de seis pequenas pustulas recentemente excisadas e maceradas em água fisiológica. O animal sobrevive.

Rhesus — 1556. Foi injetado por via endovenosa com vacina (pólpa bruta) recentemente obtida em vitelo emulsionada em água fisiológica. O material foi obtido por gentileza do Dr. Paulo Affonso Franco, Chefe do Serviço Vacinogenico do Instituto Oswaldo Cruz. Diversas papulas e vesículas que se transformam em pustulas aparecem no 5.º dia, outras surgindo no 8.º. Algumas, posteriormente, se ulceram. Foram praticadas diversas biosias (n.ºs 3791-94) no 6.º dia. O estado geral do animal agrava-se progressivamente, achando-se êle moribundo no 12.º dia de inoculação. Foi então morto pelo cloroformio e necropsiado imediatamente depois.

Rhesus — 1559. Foi inoculado por via endovenosa com o conteúdo de diversas pustulas do rhesus 1556. A temperatura eleva-se no 4.º dia de inoculação, quando surge uma erupção sobre o tronco e extremidades inferiores. Diversas vesículas e pustulas foram excisadas no 5.º dia (n.º 3802). O animal apresenta-se muito prostrado e doente, morrendo no 12.º dia de inoculação.

Rhesus — 1571. Recebeu por via intravenosa, 5 cc. de uma suspensão de pólpa vacínica em água fisiológica. O material foi o mesmo injetado no macaco precedente (rhesus 1556), tendo porém sido guardado durante 85 dias na geladeira. O animal apresenta febre e uma erupção no 5.º dia. Surgem novas vesículas no 6.º e 7.º dias, diversas lesões sendo então retiradas para estudo histológico (n.ºs 3855-3866). O animal apresenta signaes de doença durante treze dias, mas afinal sobrevive, conservando-se em boas condições de saúde:

Rhesus — 1570. Injetado por via endovenosa com o conteúdo de 5 tubos capilares contendo linfa vacínica e destinados ao mercado. O animal nada apresenta, conservando-se sempre em bom estado de saúde.

ALTERAÇÕES CITOLOGICAS NO ALASTRIM

As modificações citológicas investigadas dizem respeito, especialmente, ás lesões citoplasmáticas produzidas em células do *stratum germinativum* da epiderme. Semelham elas, de um modo geral, os corpusculos de Guarnieri da vacina e da variola.

Embora existam, também, alterações nucleares (fig. 22), são elas discretas e serão posteriormente discutidas.

Em alguns casos, embora nenhuma inclusão seja visível, nota-se material basófilo adossado á membrana nuclear (Figs. 4 e 10), bem como aspecto vacuolado do citoplasma. Outras vezes, sem que nenhuma inclusão apareça, o citoplasma da célula epidérmica apresenta, em zona limitada, uma coloração azul pela hematoxilina. Os limites entre tal zona basófila e o citoplasma normal acidófilo circunvizinho não são nitidos, notando-se contudo, que a estrutura reticular do citoplasma é perfeitamente conservada em tais áreas basófilas (figs. 5, 6 e 33).

As estampas XXVIII e XXIX, figs. 1-23, representam inclusões do alastrim vistas em material fixado no Zenker, incluído em parafina e corado pela hematoxilina-eosina. Apresentam-se sob a fórmula de massas irregulares, tintas em azul escuro ou azul violeta, as quais, tal como as inclusões da vacina, podem se alojar em uma depressão do núcleo (figs. 1 e 2). Algumas delas, fortemente coradas, circundam o núcleo de maneira peculiar, semelhando um gôrró (figs. 7, 8 e 34), mas não determinando depressões na superfície do núcleo. Também elas não se fusionam com a membrana nuclear (fig. 34).

As inclusões do alastrim são muito polimórfas, ora triangulares (figs. 19 e 27), ora em forma de crescente (figs. 9, 20 e 38), ora em forma de raquete (fig. 17). Muitas se apresentam disseminadas no citoplasma (figs. 1 e 11), ocupando, ás vezes, polos opostos do núcleo (fig.

14). Quando volumosas, elas geralmente se apresentam isoladas e solitárias (figs. 35-40). Em tais fases adiantadas, também, o citoplasma mostra grandes áreas de aparente vacuolização (figs. 36, 39 e 40).

A reação basofila das inclusões do alastrim é patente mesmo naquelas cujo volume é igual ao do núcleo (fig. 9). Em uma célula foram achadas, lado a lado, duas inclusões, uma basofila, outra acidofila (fig. 16). A Fig. 21 representa uma célula epidérmica necrosada, mostrando o núcleo em picnose e o citoplasma fortemente corado pela eosina. A inclusão se apresenta com o aspecto de uma massa redonda roseo-violácea situada em zona do citoplasma aparentemente destituída de estrutura. É possível que a reação acidofila do corpusculo do alastrim, em tal elemento, esteja ligada às alterações de necrose.

Pelo que ficou dito, resulta, pois, que os caracteres principais das inclusões do alastrim encontradas em células epidérmicas do *Macacus rhesus* são a sua reação basofila e a sua ocorrência como inclusão isolada ou solitária quando em fase adiantada de evolução.

Algumas vezes os núcleos de células contendo inclusões do alastrim apresentam estrutura normal (Figs. 3, 13, 34, 35, 36 e 37). Outras vezes, apresentam-se eles tumidos (Figs. 9, 10, 12 e 17) ou deformados (Figs. 16, 19, 20 e 35).

Não foram encontradas inclusões intranucleares semelhantes às representadas por COUNCILMANN, MAGRATH e BRINCKERHOFF em sua Estampa IX, Figuras 5, 7, 8 e 9. Em algumas células, porém, as alterações nucleares não correspondem exatamente às descritas sob os termos de picnose, cariorrhexis e kariolisis. A figura 22 mostra uma de tais células na qual o material acidofilo, marginado por cromatina basofila, aparece no nucleoplasma, aspecto tal que sugere, até certo ponto, a degenerescência oxicromica.

As inclusões apresentam notável uniformidade de aspecto em suas fases adiantadas, embora diversas amostras do vírus tivessem sido usadas. Não foram notadas variações individuais no aspecto das inclusões, o que bem se pode ver comparando as figuras 10-16 obtidas no rhesus 1465 injetado com a amostra P. L. com as figuras 4-9, rhesus 1469, e as Figuras 17-23, rhesus 1474, ambos injetados com a amostra J. P. S.. Tais amostras provêm de casos de alastrim colhidos em uma epidemia ocorrida no ano de 1932, na cidade do Rio de Janeiro.

Inclusões sob todo o ponto de vista semelhantes às precedentes, foram posteriormente observadas no rhesus 1579 e rhesus 1605, injetados com a amostra G. P. e no rhesus 1605, amostra J. M., ambas oriundas de outra epidemia de alastrim em lugar diferente (epidemia de 1933 no Estado de Minas Gerais). O mesmo aconteceu com as in-

clusões vistas nos rhesus 1577 e 1593 inoculados com a amostra de Caratinga (Estado de Minas Gerais), e com os rhesus 4060 e 1629 injetados com a amostra L., de Itaperuna, Estado do Rio de Janeiro.

Contudo, como era de esperar, embora diversos aspectos ocorram, conjuntamente, em um mesmo material, alguns dêles aparecem com mais frequencia do que outros. Depende isso em parte, certamente, do estadio evolutivo da lesão. Assim, inclusões do alastrim de pequenas dimensões eram facilmente encontradas no rhesus 1484 (Figs. 1, 2 e 3), enquanto estadios adiantados (Figs. 19, 20 e 21) eram assaz comuns no rhesus 1474 e as inclusões em forma de gôrrô (Figs. 7 e 8) no rhesus 1469; no entanto, todos esses animais foram injetados com a mesma amostra do virus (amostra J. P. S.).

Geralmente as inclusões do alastrim são mais abundantes nas fases iniciais das lesões cutaneas, especialmente no estadio de papula epidérmica. A' medida que progride a supuração, vão elas se tornando cada vez mais escassas. Contudo não é raro encontrar inclusões do alastrim e algumas de grandes dimensões, em células epidérmicas situadas nas paredes de uma pustula. Não foram elas mais encontradas em uma pustula examinada no periodo de seca.

No presente trabalho não serão examinadas as alterações acaso produzidas pelo virus do alastrim no condrioma e aparelho de Golgi. Todas as descrições são baseadas em preparações coradas pela hematoxilina-eosina. Esse metodo simples, de uso geral em trabalhos histológicos, não apresenta nenhum tempo caprichoso em sua execução. As preparações por ele conseguidas, prestam-se melhor a um estudo comparativo do que outras obtidas com metodos, sem duvida, mais desejaveis, tais os de Biondi-Heidenhain e de Giemsa.

Nitido aspecto heterogeneo das inclusões do alastrim póde ser reconhecido mesmo em preparados pela hematoxilina-eosina. Algumas delas mostram pequenas areas esfericas (Figs. 9, 14, 15 e 38) que não tomam nenhuma substancia corante e se conservam claras (vacuolos não corados). Outras mostram uma estrutura reticular típica (Fig. 20), parecendo que se continuam insensivelmente com o citoplasma adjacente (Figs. 14, 18, 37 e 38), provavelmente uma falsa impressão atribuivel aos atifícios da técnica empregada.

Grandes espaços claros, sem estrutura aparente, são frequentemente observados no citoplasma das células epidérmicas que contém inclusões, quando usada a luz natural, uma objectiva de imersão de 2 mm. e a ocular compensadora 6 de Zeiss (Fig. 21), sendo o diafragma-iris e o condensador manobrados de modo a aproveitar o maximo de luz. Quando porém, são mudadas essas condições de observação, e se emprega uma

lampada de arco, a objectiva de imersão de 2 mm. e a ocular 25 de Leitz, verifica-se a existencia de um reticulo em tais espaços claros aparentemente sem estrutura (Fig. 23). Esse reticulo muito se assemelha, pelas dimensões de suas malhas, ao verificado em celulas epidermicas normais adjacentes, dele diferindo apenas por não se corar pela eosina e não ser visivel quando usada iluminação intensa, Algumas vezes ele se mostra levemente tinto pela hematoxilina. As figuras 29 e 40 tambem representam a mesma celula reproduzida nas figuras 21 e 23. Na figura 40 o diafragma foi parcialmente fechado e nela se vê um reticulo ocupando porções do citoplasma que coincidem com os vacuolos vistos na mesma celula (Fig. 39) quando usado o maximo de luz.

Um reticulo semelhante foi igualmente encontrado no citoplasma aparentemente vacuolado que circunda as inclusões do alastrim, nas celulas representadas nas figuras 13, 15 e 19.

Por vezes um filamento ou membrana acidofilos (Figs. 9, 16, 19, 21, 38 e 40) separa de modo nitido essas zonas claras de citoplasma onde se alojam as inclusões, do citoplasma adjacente onde a estrutura normal é preservada.

ALTERAÇÕES CITOPLASMATICAS NA VACINA

As figuras 24, 25, 41 e 42 representam inclusões da vacina com dimensões semelhantes ao nucleolo da celula epidermica em que são observadas. Circumnucleares em algumas celulas (Figs. 24 e 25), elas aparecem disseminadas no citoplasma em outras celulas (Figs. 41 e 42), outras vezes sendo isoladas (Fig. 24), ainda outras dispostas em polos opostos do nucleo (Figs. 25 e 42).

A sua coloração é uniforme nos preparados pela hematoxilina-eosina. Algumas (Figs. 25, 26 e 28) se tingem em tonalidades que vão do violeta-acinzentado ao azul escuro (reação basofila), ao passo que outras (Figs. 24 e 27) coram-se em roseo avermelhado (reação acidofila).

Algumas inclusões da vacina mostram em seu interior pequenos espaços claros ou vacuolos descorados (fig. 28), ao passo que em outras é bem aparente uma estrutura reticulada (Fig. 42).

As figuras 29, 30, 31, 32, 43 e 44 ilustram inclusões da vacina como o aspecto de massas irregulares ou de granulos grossos ou finos difundidos no citoplasma. Algumas atingem tamanho relativamente grande. Quando numerosas, elas se alojam em uma area clara do citoplasma bem separada do citoplasma adjacente por um filamento ou membrana (Figs. 31, 32 e 41).

As inclusões da vacina contidas em uma mesma célula não se coram com a mesma tonalidade. Enquanto umas se apresentam de cor cinzenta-violacea, outras mostram nitida coloração rosea. Essa variabilidade nas reações de coloração das inclusões da vacina, em uma mesma célula epidérmica, são um detalhe que chama a atenção no material de macacos injetados com o vírus da vacina, tal a frequência e a regularidade com que aparece.

O núcleo pode apresentar estrutura aparentemente normal em células que contém numerosos corpusculos da vacina (fig. 29). Quasi sempre, porém, os núcleos mostram-se tumidos (figs. 25, 26 e 27) ou deformados (figs. 30, 31 e 32).

DISCUSSÃO

Ao descrever aspectos diversos nas alterações citoplasmáticas do alastrim e da vacina não foi nossa tenção afirmar que elas representam estadios evolutivos diversos de uma mesma lesão. Naturalmente isso poderá ser o caso em algumas delas. Não se deve, porém, excluir a suposição de que eles representem, desde o inicio, graus diferentes em que foi atingida a célula pelo vírus respectivo. Não é necessario, assim, que uma inclusão de grandes dimensões, suponhamos maior que o núcleo, haja forçosamente passado pela fase de inclusão de pequenas dimensões, digamos do tamanho do nucleolo. É possível, mesmo que inclusões de pequenas dimensões não prosigam em sua suposta evolução, e conservem tais dimensões. Representarão, nesse caso, a fase final de alterações específicas que os vírus do alastrim ou da vacina ocasionaram na célula considerada.

A primeira impressão que se tem ao fazer o estudo comparativo das inclusões celulares específicas do alastrim e da vacina nas lesões cutâneas do macaco rhesus é a de grande variabilidade, explicavel, naturalmente, pela ocorrência de fases evolutivas diferentes na formação das inclusões e pela extensão maior ou menor que podem ter, em cada célula, as lesões específicas produzidas pelos vírus.

Quando de pequenas dimensões e discretas, as inclusões citoplasmáticas são muito semelhantes em ambos os vírus, conforme se vê comparando a fig. 11 que representa duas pequenas inclusões do alastrim situadas em polos opostos do núcleo, com as inclusões da vacina ilustradas na figura 25.

Exame mais atento revela, contudo, diferenças entre as inclusões do alastrim e as da vacina, embora sejam elas delicadas e ligeiras. Dizem elas respeito ao numero das inclusões presentes em cada célula e á sua coloração.

As inclusões do alastrim são ordinariamente solitarias (Figs. 2, 3, 8, 12, 13, 15, 17, 19 e 20) mesmo nos estadios em que apresentam o mesmo volume ou são maiores que o núcleo da célula onde ocorrem (Figs. 9 e 20). Quando de dimensões pequenas, podem elas, no entanto, ser em numero de 2-4, constituindo, muitas vezes, corpusculos paranucleares ou circumnucleares (figs. 1, 7 e 11).

Se existe, como atraz foi mencionado, uma semelhança entre as inclusões do alastrim e as da vacina de dimensões pequenas, uma diferença nitida aparece quando são comparadas entre si inclusões de maiores dimensões. Com efeito, ao passo que as inclusões do alastrim, nesse aspecto, se conservam unicas ou solitarias no citoplasma das células epidérmicas do macaco rhesus, as da vacina são sempre numerosas ou 'multiplas em tais estadios onde existe extenso aspecto vacuolado do protoplasma. Parece que esse aspecto não é excepcional em estadios evolutivos adiantados dos corpusculos da vacina e não depende do tecido, nem do animal empregado. Com efeito, figuras mostrando inclusões da vacina numerosas, grandes e irregulares, são representadas no trabalho de GOODPASTURE, WOODRUFF e BUDDINGH (Fig. 1, Estampa 42), em células epiteliaes do ectoderma da membrana corio-alantoidiana do embrião de galinha, e no de HUECKEL (Figuras 93 e 113, Estampa III), em células da cornea do coelho.

A outra diferença diz respeito ás reações de coloração. As inclusões do alastrim coram-se, de modo regular, em azul escuro, quando de pequenas dimensões (Figs. 1, 7, 8 e 12) e em cinzento-azulado quando maiores e do tamanho do núcleo (Figs. 9 e 20). As da vacina mostram uma tonalidade de coloração muito caprichosa. Mesmo quando de pequenas dimensões, e do tamanho do nucleolo elas se apresentam, ora nitidamente coradas em roseo pela eosina (Fig. 24) ora, o que é mais comum, em azul (Figs. 25, 26 e 28). A esse respeito porém, a feição mais característica das inclusões da vacina é a coexistencia, no citoplasma de uma mesma célula, de inclusões coradas umas em azul, outras em roseo (Figs. 29-32).

Tendo notado a frequencia com que tais inclusões policromatofilas eram achadas nas lesões experimentais da vacina no macaco rhesus, resolvemos procura-las, de modo sistemático, nas lesões do alastrim. O resultado foi encontrarmos a célula representada na Fig. 16, na qual aparecem duas inclusões em forma de crescente, uma corada em azul, outra em roseo. Foi esse, aliás, o unico exemplo ilustrando a policromatofilia das inclusões do alastrim e a raridade do fato forma grande contraste com o que acontece nas inclusões da vacina.

RESUMO

1 — Vesículas e pustulas contendo numerosas inclusões citoplasmicas nas células epidérmicas, foram regularmente produzidas no macaco (*Macacus rhesus*), quer com o vírus do alastrim, quer com o da vacina, após inoculação endovenosa e sem previa escarificação. O vírus do alastrim parece menos virulento para essa espécie de macaco que o da vacina. Ao passo que 12 macacos rhesus injetados por via endovenosa com sete amostras diferentes de vírus do alastrim, após apresentarem com regularidade uma infecção experimental, sobreviveram e se conservaram em boa saúde, a injeção endovenosa do vírus da vacina recentemente preparado (pólpa bruta) produziu a morte em 2, dentre 4 animais experimentados.

2. — Foram notadas diferenças pequenas, mas nitidas, na morfologia das inclusões do alastrim e da vacina, em material fixado no liquido de Helly, incluído em parafina e corado pela hematoxilina-eosina. Dizem elas respeito ao numero de inclusões encontradas em cada célula epidérmica e ás suas reações de coloração.

3. -- As inclusões do alastrim, quando apresentam grandes dimensões, conservam-se unicas ou solitarias no citoplasma das células epidérmicas do macaco rhesus, e coram-se em tonalidade que varia do azul escuro ao cinzento-azulado. Comtudo, em células que sofreram necrose, ou naquelas contendo 2 a 4 inclusões de pequenas dimensões, por vezes elas se mostram coradas em roseo.

4. — As inclusões da vacina, quando em fase adeantada de desenvolvimento, são multiplas nas células epidérmicas do macaco rhesus e mostram, regularmente, uma policromatofilia característica.

EXPLICAÇÃO DAS ESTAMPAS XXVIII — XXXI

As figuras 1 a 23 e 33 a 40 representam células epidérmicas de *Macacus rhesus* com as inclusões do alastrim.

As figuras 24 a 32 e 41 a 44 ilustram células epidérmicas de *Macacus rhesus* com as inclusões da vacina.

Todas essas células são encontradas em lesões cutaneas (vesículas e pustulas) experimentalmente produzidas no macaco.

As figuras 1 a 22 e 24 a 32 foram desenhadas na altura da mesa com a ocular compensadora 6 de Zeiss e objetiva de imersão homogenea $1/12 \times 100$ ZEISS. A figura 23 foi desenhada na altura da mesa com a Ocular 25 ZEISS e objetiva de imersão homogenea $1/12 \times 100$ ZEISS.

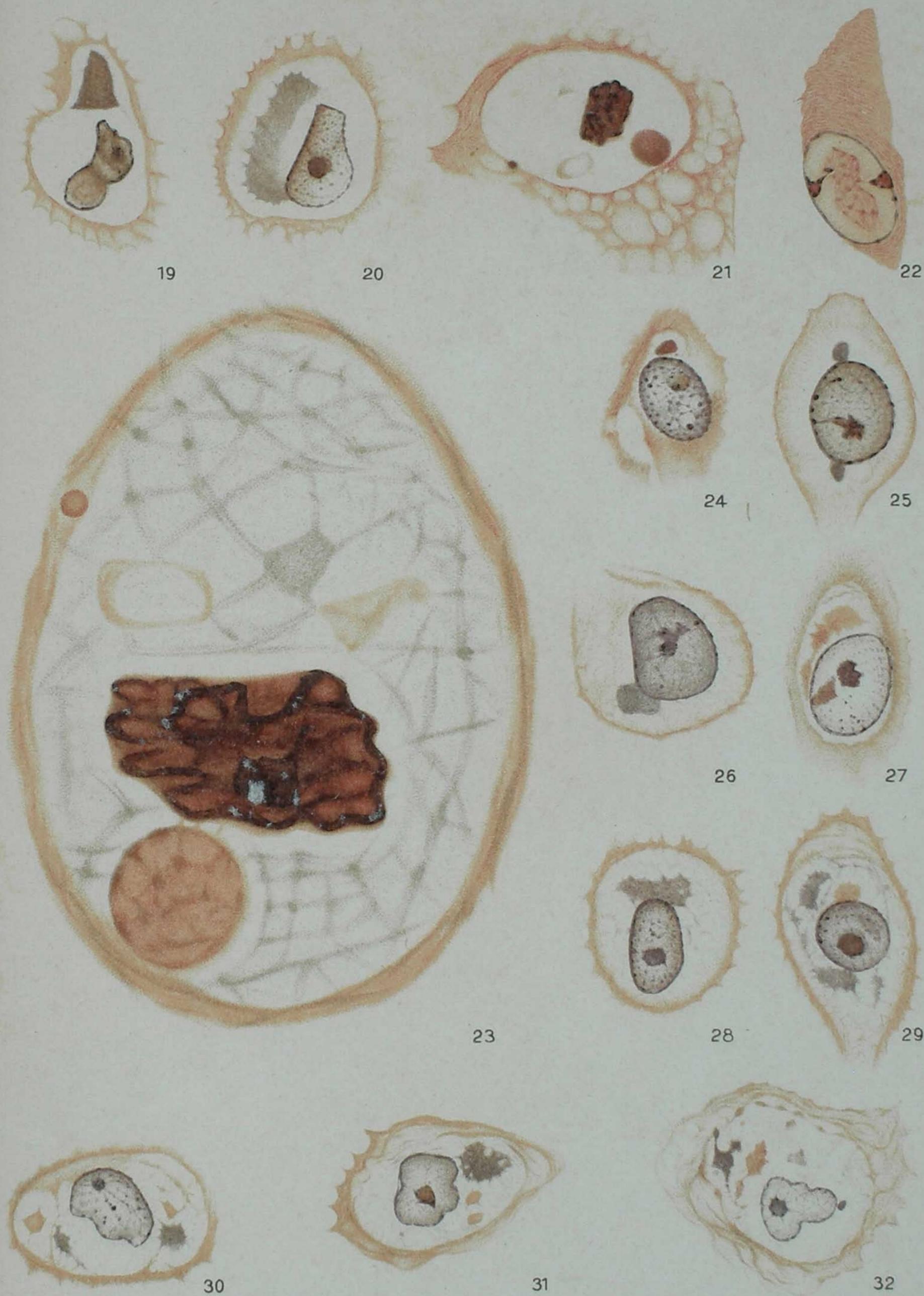
As figuras 33 a 44 são microfotografias feitas com o aumento de 1.150 diâmetros.

Figuras	1	a	3	—	Celulas epidermicas do rhesus	—	1484	(n.º 3663).
Figuras	4	a	9	—	Celulas epidermicas do rhesus	—	1469	(n.º 3602).
Figuras	10	a	16	—	Celulas epidermicas do rhesus	—	1465	(n.º 3593).
Figuras	17	a	23	—	Celulas epidermicas do rhesus	—	1474	(n.º 3632).
Figura			24	—	Celula epidermica do rhesus	—	1571	(n.º 3860).
Figuras	25	a	32	—	Celulas epidermicas do rhesus	—	1556	(n.º 3791).
Figuras	33	a	40	—	Celulas epidermicas do rhesus	—	1474	(n.º 3632).
Figuras	41	a	44	—	Celulas epidermicas do rhesus	—	1556	(n.º 3791).



A. Leal, del.

Drs. Torres e Teixeira : Estudo comparativo das inclusões do alastrim e da vacina no macaco (*Macacus rhesus*).
A comparison of the inclusion bodies of alastrim and vaccinia in the monkey (*Macacus rhesus*).



A. Leal, del.

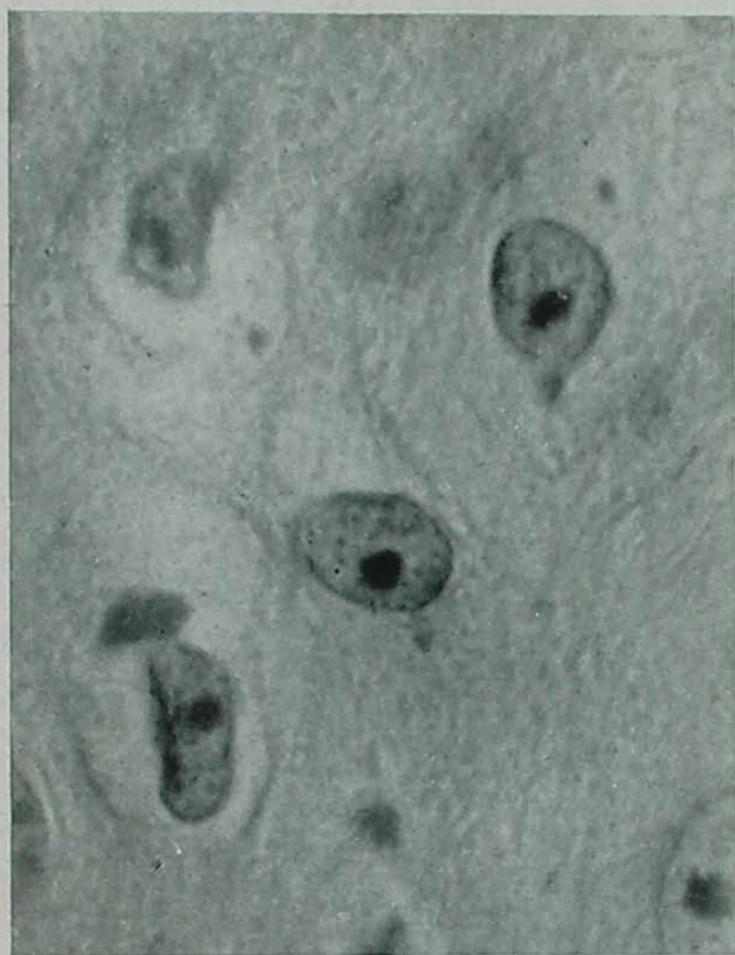
Drs. Torres e Teixeira : Estudo comparativo das inclusões do alastrim e da vacina no macaco (*Macacus rhesus*).
A comparison of the inclusion bodies of alastrim and vaccinia in the monkey (*Macacus rhesus*).



33



34



35



36



37



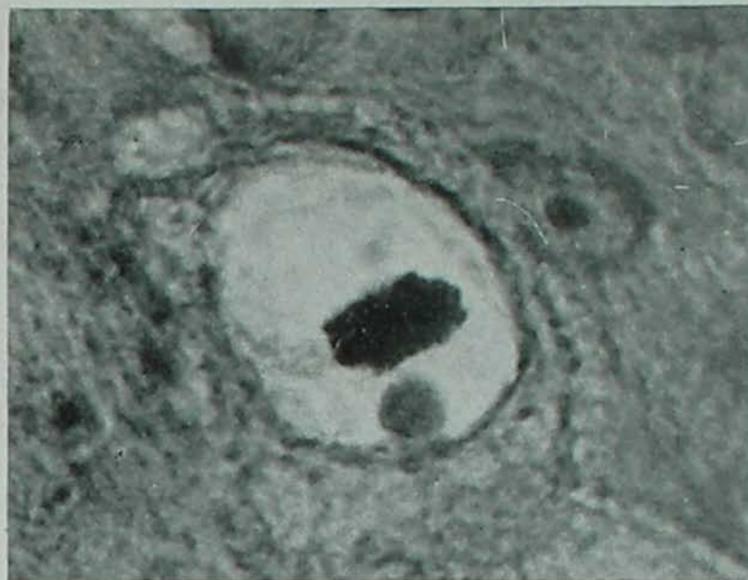
38

Fotomicro de J. PINTO

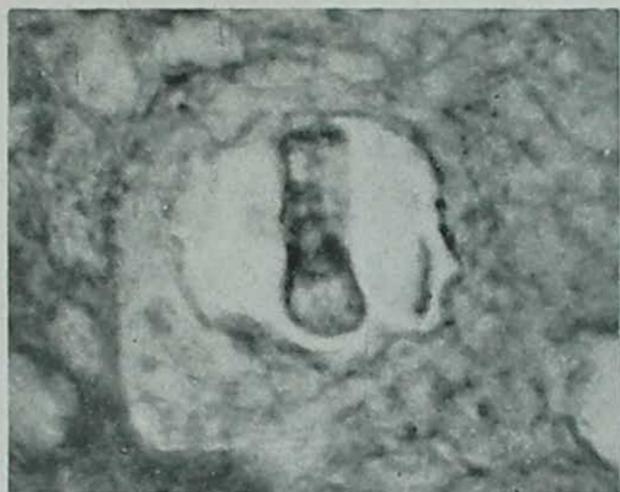
Drs. Torres e Teixeira : Estudo comparativo das inclusões do alastrim e da vacina no macaco (*Macacus rhesus*).
A comparison of the inclusion bodies of alastrim and vaccinia in the monkey (*Macacus rhesus*).



39



40



41



42



43



44

Fotomicro de J. PINTO

Drs. Torres e Teixeira : Estudo comparativo das inclusões do alastrim e da vacina no macaco (*Macacus rhesus*).
A comparison of the inclusion bodies of alastrim and vaccinia in the monkey (*Macacus rhesus*).