

Alterações nucleares das cellulas do figado nas infecções de *MACACUS RHESUS* e *M. CYNOMOLGUS* pelo virus da febre amarella.

Pelo Dr. C. MAGARINOS TORRES.

Examinando, a pedido dos Drs. BEAUREPAIRE ARAGÃO, A. MARQUES DA CUNHA e J. MUNIZ, material histologico proveniente de diversos *Macacus rhesus* e *M. cynomolgus*, a maioria inoculados com o virus da febre amarella, outros não inoculados e mortos de tuberculose e causas não esclarecidas, fomos levados a confirmar as verificações daquelles pesquisadores no que diz respeito aos seguintes pontos: 1º.—A inoculação de sangue de casos benignos de febre amarella nos primeiros dias de molestia, ou de *Aedes ægypti* infectados reproduz em *M. rhesus* as lesões obtidas por STOKES, BAUER e HUDSON, pela inoculação do virus africano (ARAGÃO); 2º.—Outras vezes, as lesões produzidas no figado, embora da mesma natureza das mencionadas pela Comissão Americana, offerecem menor intensidade, acontecendo que, pela passagem em serie, em *M. rhesus*, ellas podem apresentar uma notavel variabilidade, especialmente no que respeita á degeneração gordurosa e necrose das cellulas hepaticas; em duas occasiões foi mesmo possivel observar inteira auzencia das lesões mencionadas pela Comissão Americana em figados capazes, no entanto, de reproduzir, na passagem seguinte, aquellas alterações (CUNHA e MUNIZ).

Particularmente difficil tornou-se assim, por vezes, a interpretação do exame histo-pathologico justamente na questão que mais interessava ao investigador que era a de decidir se o animal apresentava ou não as lesões da febre amarella experimental.

Em *M. rhesus* que, inoculados com o virus da febre amarella, morreram com symptomas e lesões semelhantes aos descriptos por STOKES, BAUER e HUDSON, verificámos ao lado das “lesões typicas” daquelles auctores, alterações nucleares da cellula hepatica, da mesma natureza das descriptas em certas doenças causadas por virus filtraveis (herpes, varicella, virus III do coelho) ora sob o nome de “inclusões acidophilas intranucleares”, ora sob o de “degeneração oxychromatica”.

Tendo já analysado detalhadamente, em outro lugar, o referido processo, nos limitamos aqui a reproduzir uma estampa colorida na qual procurámos dispor as diversas phases do processo, de accordo com a sua provavel seriação. Accentuaremos apenas aqui que, as figuras *g* e *h*, (Est. colorida) pela sua abundancia relativa e configuração caracteristica, facilitam o reconhecimento do processo, não tendo, afóra isso importancia especial; estudos posteriores, tambem, nos mostraram que, em alguns casos, o nucleolo apparece perfeitamente distincto da substancia acidophila intranuclear que se accumula na porção central do nucleo a qual assim, se origina independentemente de substancias nucleolares.

Completamos a documentação com duas microphotographias, feitas com identica ampliação, uma de figado de *M. rhesus* não inoculado e cujos

nucleos mostram estrutura conservada; outra de um figado de *M. rhesus* inoculado com o virus da febre amarella e na qual quasi todas as cellulas mostram a alteração mencionada.

Bem caracterizada a "degeneração oxychromatica" das cellulas do figado nos animaes inoculados com virus, e conhecida as relações desse processo com determinadas doenças causadas por virus filtraveis, algumas questões logo surgiam cuja solução offerencia bastante interesse.

Seria a degeneração oxychromatica da cellula hepatica uma alteração cellular banal e commum, comparavel assim á degeneração gordurosa, á necrobiose daquelle elemento, processos estes ultimos, que são assaz frequentes não só em *M. rhesus* inoculados com virus amarillico, como nos mortos de tuberculose e de causas obscuras e tambem em outros macacos inoculados com diversos organismos (*Cebus macrocephalus* inoculados com *Leptospira icteroides* - MULLER, NOGUCHI), ou seria ella uma alteração peculiar á infecção pelo virus da febre amarella?

A resposta aqui depende, naturalmente, de um modo estreito, do numero do *M. rhesus* não inoculados e submettidos ao exame histo-pathologico. Quanto maior elle fôr, tanto mais segura a conclusão.

Até o presente momento não conseguimos encontrar a degeneração oxychromatica senão em *M. rhesus* inoculados com o virus, embora os não inoculados que examinámos apresentassem alterações cellulares de natureza variada, taes como degeneração gordurosa, necrose e necrobiose. Assim sendo, devemos responder que, baseados em verificações feitas até o momento, a degeneração oxychromatica da cellula hepatica constitue uma alteração cellular encontrada unicamente em macacos inoculados com o virus da febre amarella e sob esse ponto de vista pode ser tida como uma lesão característica do figado na febre amarella experimental, não tendo relação com outras alterações cellulares communs.

Outra questão era estabelecer qual o valor da degeneração oxychromatica como lesão capaz de autorizar um diagnostico positivo de infecção na febre amarella experimental no decurso de experimentações com o virus.

Que um tal diagnostico offerece reaes dificuldades se quizermos baseal-o, unicamente, em dados histo-pathologicos, ficou atraz claramente indicado; a razão está na grande variabilidade das lesões de animal para animal, no papel importante que podem ter factores subjectivos na analyse histo-pathologica e ainda no facto de lesões hepaticas até agora ahi assignaladas, taes a degeneração gordurosa, necrose e necrobiose, não serem lesões de modo algum especificas da infecção pelo virus amarillico.

É claro que se a degeneração oxychromatica constituisse um processo, embora especifico, mas evidenciavel com dificuldade ou de modo inconstante, ficaria logo prejudicada a ideia de aproveitall-a sob esse ponto de vista.

Mas tal não succede, e a fig. 2 documenta de modo cabal, a intensidade que algumas vezes ella possui nas infecções pelo virus brasileiro.

Na nossa opinião, a degeneração oxychromatica constitue um dos melhores criterios para decidir se o *M. rhesus* apresenta ou não lesões attribueis ao virus da febre amarella, desde que sejam feitas certas reservas que decorrem das considerações que passamos a analysar.

Não pudemos, ainda, realizar o estudo systematisado das lesões nucleares, sacrificando o animal inoculado em phases da evolução da doença experimental que julgássemos mais opportunas; aproveitámos, apenas, o material de BEAUREPAIRE ARAGÃO, A. MARQUES DA CUNHA e J. MUNIZ, obtido no decurso de pesquisas que tinham um objectivo diverso. Comtudo já alguma coisa podemos adiantar pelo estudo desse material.

Assim, a degeneração oxychromatica existia em quatro *M. rhesus* sacrificados no quinto dia de inoculação com figado contendo virus, faltando em um outro, sacrificado com o mesmo prazo de infecção; era presente em quatro animaes sacrificados no sexto dia, em um *M. cynomolgus* sacrificado no setimo dia, em um *M. rhesus* no oitavo dia, em um no nono dia, em dois no decimo dia, em um no decimo primeiro dia, em um *M. cynomolgus* no decimo quarto dia e em um *M. rhesus* sacrificado no decimo quinto dia. Não mais a encontrámos em um *M. rhesus* que, sobrevivendo, foi sacrificado no decimo nono dia.

Quanto á intensidade ou á facilidade com que era encontrada, temos a informar que se apresentava extraordinariamente abundante em dois *M. rhesus* sacrificados no 6º dia, um inoculado com sangue, outro com figado de macaco contendo virus, ainda em um sacrificado no 8º e em dois outros sacrificados no 10º dia, um dos quaes fôra inoculado com *Aedes aegypti* infectados (v. a fig. 2).

Em quatro *M. rhesus* sacrificados no quinto dia, em um *M. cynomolgus* sacrificado no setimo dia, em um *M. rhesus* sacrificado no nono dia e em um outro sacrificado no decimo primeiro, a degeneração oxychromatica era bastante abundante, sendo facilmente encontrada nos córtes histologicos.

Em dois *M. rhesus* sacrificados no sexto dia, e em um *M. cynomolgus* sacrificado no decimo quarto dia, ella era discreta.

Finalmente, em um *M. rhesus* morto no decimo quinto dia, ella era encontrada com difficuldade.

Em relação á sua constancia nos animaes inoculados, as nossas observações não foram ainda realisadas de modo satisfactorio, visto como dependem, necessariamente, da collaboração effectiva dos pesquisadores que trabalham com o virus e assim, só mais tarde, poderão ser levadas a effeito.

Examinando porém, juntamente com CUNHA e MUNIZ, uma serie de inoculações em *M. rhesus*, confirmamos as suas verificações a respeito da variabilidade das lesões hepaticas e da auzencia das descriptas como typicas por STOKES, BAUER e HUDSON, em macacos (2ª. e 5ª. passagens) cujo figado, no entanto, continha o virus conforme mostraram os symptomas e as lesões em animaes inoculados posteriormente.

Em um dos animaes (2ª. passagem), a degeneração oxychromatica foi a unica lesão da cellula hepatica verificada, sendo ahi, bastante intensa: em um outro (5ª. passagem), ella mesma não poude ser reconhecida mostrando o figado apenas discreta infiltração gordurosa periporta.

RESUMO E CONCLUSÕES.

No figado de um *Macacus rhesus* inoculado por BEAUREPAIRE

ARAGÃO com sangue de um caso benigno de febre amarella e no qual elle descreveu symptomas e lesões typicas semelhantes ás obtidas por STOKES, BAUER e HUDSON pela inoculação com o virus africano no mesmo animal, encontrámos alterações nucleares da mesma natureza das assignaladas no herpes zoster, herpes symptomatico, varicella e virus III do coelho e descriptas ora sob o nome de "inclusões acidophilas intranucleares" (LIPSCHÜTZ, GOODPASTURE), ora sob o de "degeneração oxychromatica" (LAUDA e LUGER).

Alterações nucleares semelhantes da cellula hepatica encontrámos, posteriormente em 13 *M. rhesus* e 2 *M. cynomolgus* inoculados com o virus brasileiro da febre amarella o qual fôra isolado independentemente por BEAUREPAIRE ARAGÃO e depois por A. MARQUES DA CUNHA e J. MUNIZ de dois casos benignos de febre amarella, tendo sido um dos macacos injectado directamente com o sangue do doente; dois macacos foram inoculados com *Aedes ægypti* infectados em homem e em macaco; os demais foram animaes empregados em passagens em serie do virus pelo macaco, e talvez esse facto explique até certo ponto, as notaveis differenças por vezes encontradas nas alterações histopathologicas do figado, visto como, em condições naturaes, o virus nunca passa directamente de homem para homem.

A intensidade com que se apresenta a degeneração oxychromatica de modo algum está na dependencia das alterações do conteúdo gorduroso, necrose e necrobiose encontradas; em um caso, ella era a unica alteração presente no figado, sendo então particularmente intensa.

As inclusões acidophilas intranucleares (degeneração oxychromatica) não foram encontradas em diversos *M. rhesus* não inoculados e mortos por causas obscuras; no entanto, em taes figados eram presentes infiltração e degeneração gordurosas associadas a alterações de necrose e necrobiose.

Alguns estadios (figuras intranucleares "em borboleta" e "em ameoba", v. fig. *g* e *h*, Est. colorida) sendo abundantes, facilitam, em virtude de sua configuração especial, o reconhecimento da degeneração oxychromatica em córtes feitos segundo uma technica rapida (pequenos fragmentos de figado fixados em formol aquecido a 60°C.—trinta minutos, córtes em congelação, hematoxylina, eosina, alcool absoluto, phenol-xylool-creosoto, xylool, balsamo), não tendo, afóra isso, importancia especial.

Ao passo que a degeneração e infiltração gordurosa, bem como a necrose e a necrobiose da cellula hepatica apresentam variações consideraveis em sua intensidade de um para outro animal em uma passagem em serie não interrompida do virus pelo *M. rhesus*, chegando mesmo a faltar inteiramente em dois animaes cujo figado, no entanto, mostrou-se capaz de reproduzir symptomas e lesões typicas na passagem seguinte, as inclusões acidophilas intranucleares (degeneração oxychromatica), de regra, se encontram com muito maior regularidade. Em dois *M. rhesus* mortos no 6º dia, em um no 8º e em dois no 10º dia, a degeneração oxychromatica era de tal modo abundante que quasi todas as cellulas do figado se mostravam attingidas (v. fig. 2); em um delles, conforme atraz ficou dito, sendo bastante intensa, era a unica alteração encontrada no figado.

Em *M. rhesus* mortos no 14º e no 15º dias de inoculação, a dege-

neração oxychromatica era escassa, mostrando-se inteiramente ausente em um outro morto no 19º dia.

Apparentemente ocorre, assim, uma desapareção gradual das inclusões acidophilas intranucleares das cellulas hepaticas depois de ahi terem sido muito abundantes, em alguns casos, no 10º dia (v. fig. 2). No entanto, a degeneração gordurosa e a necrose podem persistir, sendo, de facto ainda intensas em um macaco morto no 15º dia, e no qual a degeneração oxychromatica, mostrava-se, comtudo, assaz escassa.

Em um macaco morto no 5º dia, o qual transmittio o virus a um outro animal, não foi encontrada degeneração oxychromatica no figado, sendo uma ligeira infiltração gordurosa periporta a unica lesão ahi existente; a degeneração oxychromatica, no entanto, reapareceu no animal inoculado em seguida.

Levando em conta que, algumas vezes, na passagem em serie não interrompida do virus da febre amarella pelo *M. rhesus*, o figado pode apresentar uma apparencia normal, que as alterações histopathologicas são muito variaveis em intensidade de um animal para outro e que a intensidade com que se apresenta a degeneração oxychromatica varia conforme o dia de inoculação em que morre o animal, as inclusões acidophilas intranucleares são, na nossa opinião, mais capazes de assegurar o diagnostico histopathologico da doença provocada no *M. rhesus* de que qualquer outra alteração anteriormente ahi assignalada.

As verificações effectuadas não contradizem a hypothese de que as inclusões acidophilas intranucleares estejam associadas á presença do virus no interior das cellulas affectadas, de accordo com o que muitos auctores affirmam em relação a outras doenças produzidas por virus filtraveis onde existem alterações nucleares semelhantes (herpes zoster, herpes symptomatico, varicella, virus III do coelho).

Admittindo-a, facil se torna explicar a apparente independencia entre degeneração oxychromatica e degeneração gordurosa, necrose e necrobiose no figado: as primeiras são devidas á presença e talvez, multiplicação do virus no interior das proprias cellulas, as segundas se achando antes na dependencia de uma toxemia concomitante.

SUMMARY AND CONCLUSIONS.

In the liver of one *Macacus rhesus* injected by BEAUREPAIRE ARAGÃO with blood of one benign case of yellow fever and in which he described (1) symptoms and typical lesions similar to those obtained by STOKES, BAUER and HUDSON in *M. rhesus* injected with the African virus, it has been found (2) changes in the nuclei analogous to those referred to in herpes zoster, symptomatic herpes, varicella and virus III infection of rabbits, and described either under the name of "acidophilic intranuclear inclusions" (LIPSCHÜTZ, GOODPASTURE), either as "oxychromatic degeneration" (LAUDA and LUGER).

(1) ARAGÃO, H. B.—Brasil Medico, 1928, Anno XLII n. 27.

ARAGÃO, H. B.—Comunicação á "Societé Brésilienne de Biologie" em 24 de Junho de 1928.

(2) TORRES, C. M.—Comunicações á "Societé Brésilienne de Biologie" em 24 de Junho e 29 de Julho de 1928.

Similar changes in the nuclei of liver cells were afterwards found by me in 13 *M. rhesus* and 2 *M. cynomolgus* injected with the Brazilian virus of yellow fever recovered independently by BEAUREPAIRE ARAGÃO (3) and A. MARQUES DA CUNHA and J. MUNIZ (4) from two benign cases of yellow fever; one of these monkeys was directly injected with the blood from the patient; two were injected with *Aedes aegypti* after having fed upon the blood of yellow fever patients or experimentally infected *M. rhesus*; the others were monkeys used in an unbroken series of passages of the virus through *M. rhesus*, and perhaps this accounts for notable differences found in the histopathology of the liver from case to case, as under natural conditions the virus never passes directly from man to man.

The degree in which the oxychromatic degeneration occurs is in no way dependent upon the degree in which fatty and necrobiotic changes are found; in one instance it was the only change present in the liver, being there particularly intense.

The acidophilic intranuclear inclusions (oxychromatic degeneration) were not present in several *M. rhesus* not inoculated and dying of tuberculosis or obscure causes; notwithstanding in these livers, fatty infiltration and degeneration associated to necrobiotic changes were found.

Some stages ("butterfly" and "entamoeba-like" intranuclear figures, s. coloured Plate figs. *g*, and *h*) are rather frequent and by its characteristic shape facilitate the recognition of oxychromatic degeneration in sections made by a rapid technique (small pieces of liver fixed in formaldehyde heated to 60°C—thirty minutes, frozen sections, hematoxylin, eosin, absolute alcohol, phenol-xylool-creosote, xylool, balsam) having no peculiar importance besides this.

Since the fatty degeneration and infiltration, necrosis and necrobiosis of the cells present considerable variations in degree from case to case in an unbroken series of passages of the virus through *M. rhesus*, lacking in two animals the liver of which was able to reproduce typical symptoms and lesions in the following passage, the acidophilic intranuclear inclusions (oxychromatic degeneration), as a rule, were found with much more regularity. In two *M. rhesus* killed on the 6th day, in one on the 8th, and in two on the 10th day, oxychromatic degeneration was so abundant as to occur in almost every liver cell (s. fig. 2); in one instance, as previously reported, being rather intense, it was the only change found in the liver.

In two *M. rhesus* killed on the 14 and 15th days of inoculation, the oxychromatic degeneration was scarce and it was entirely absent in another killed on the 19th day.

Apparently it occurs, therefore, a gradual disappearance of the acidophilic intranuclear inclusions from the liver cells after having been in some cases very pronounced on the 10th day (s. fig. 2). Notwithstanding the fatty and necrobiotic changes can persist and were, in fact, rather in-

TORRES, C. M.—Brasil-Medico, 1928, Anno XLII, n. 36.

TORRES, C. M.—Sciencia Medica, Anno VI, n. 9, 1928.

(3) ARARÃO, H. B.—loc. cit.

(4) CUNHA, A. M. e MUNIZ, J.—Comunicação á "Societ  Brésilienne de Biologie", em 29 de Julho de 1928.

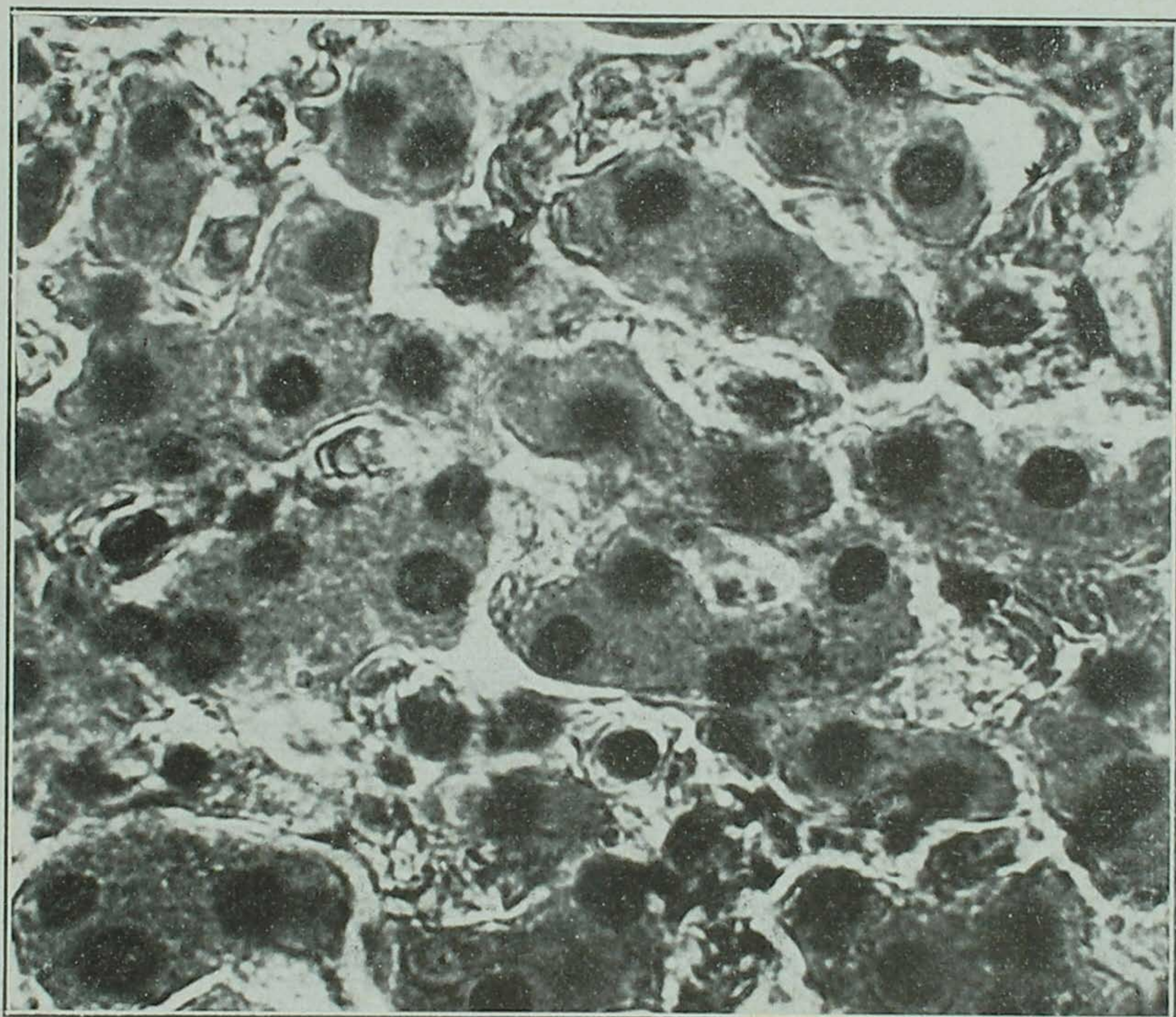


Fig. 1—Corte de figado de *M. rhesus* não inoculado. As cellulas hepaticas mostram nucleos normaes. Phot. J. Pinto

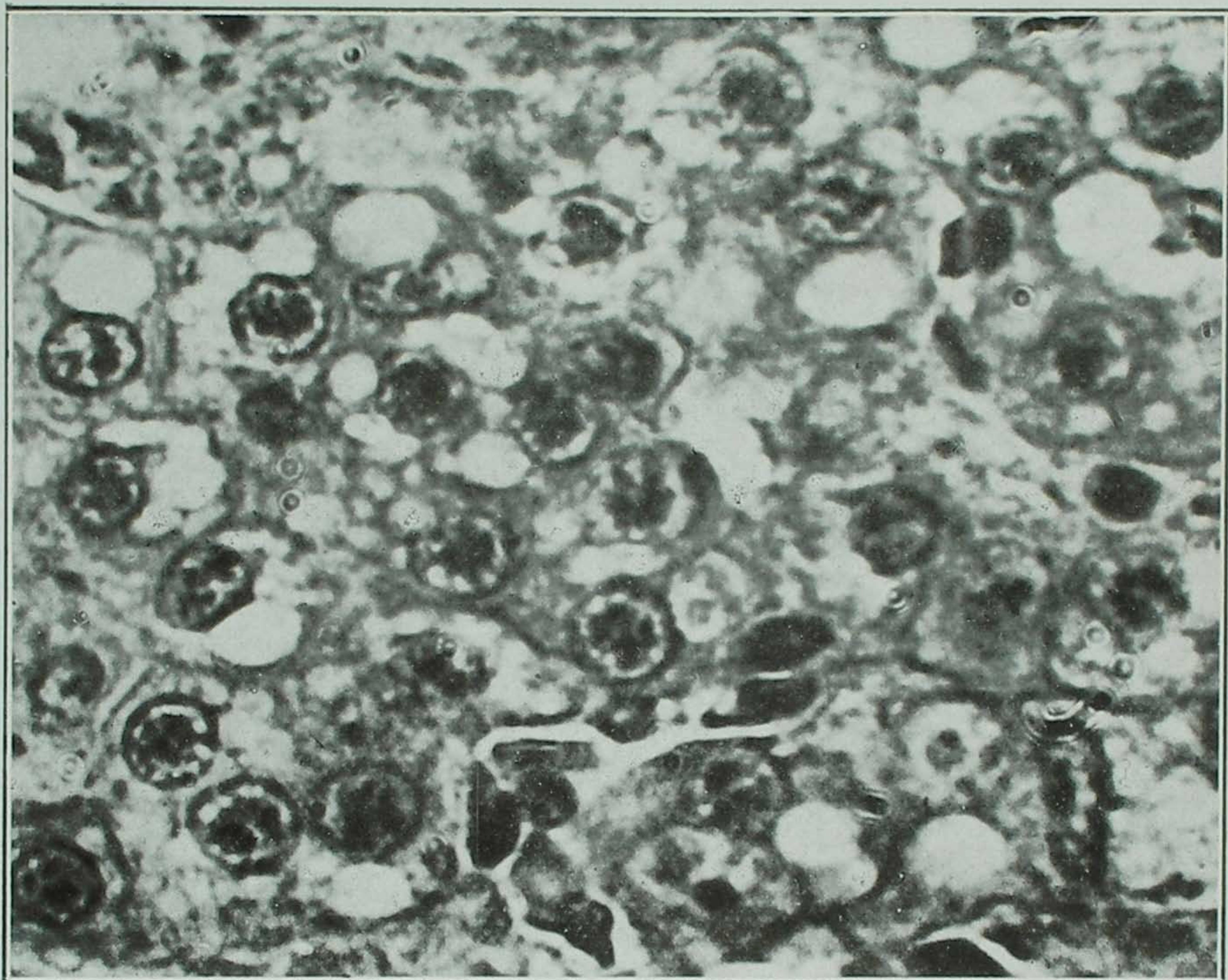
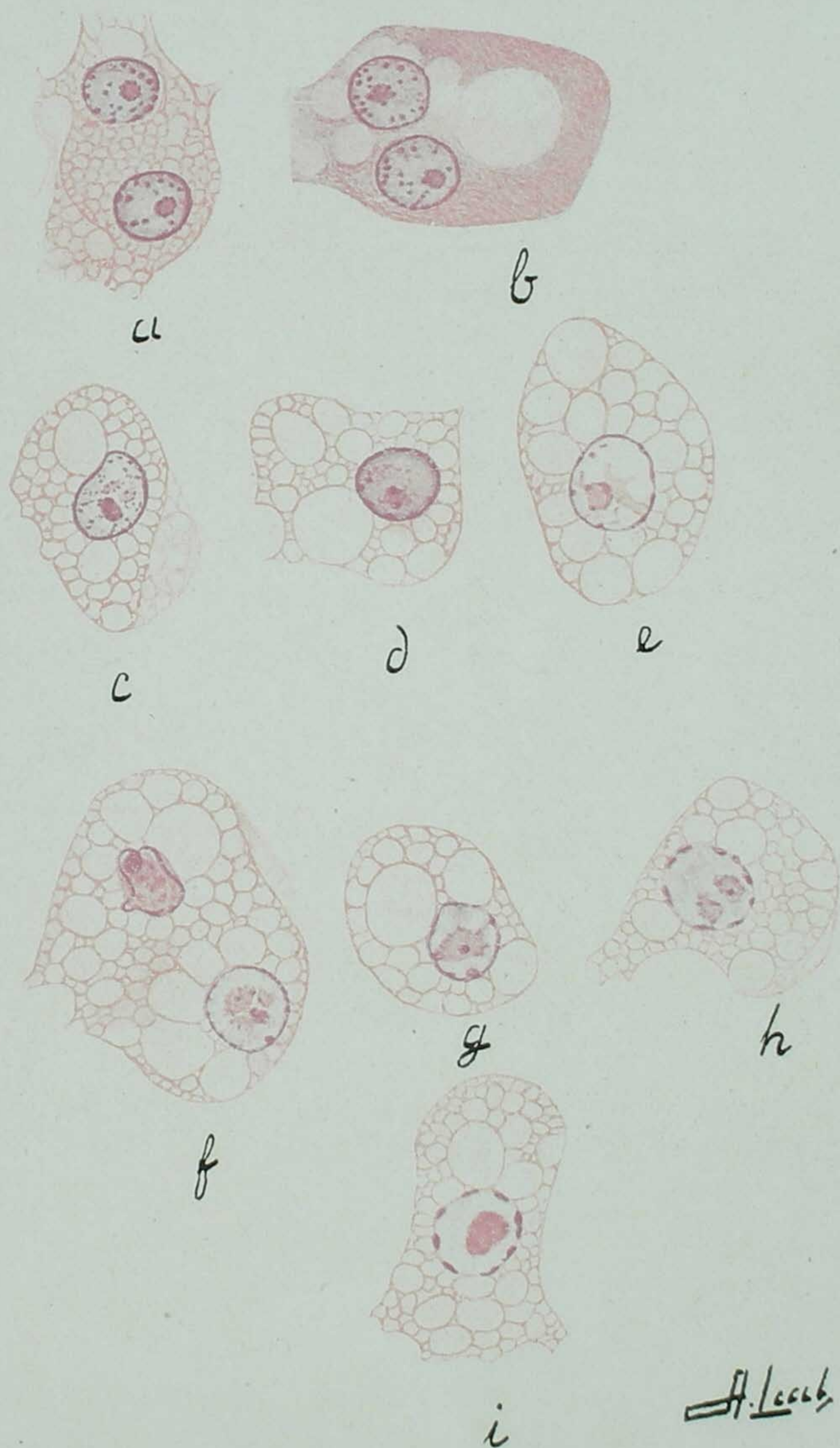


Fig. 2—Corte de figado de *M. rhesus* inoculado com *Aedes aegypti* infectados em doente de febre amarella e morto no decimo dia de inoculação. Quasi todas as cellulas apresentam inclusões acidophilas intranucleares.

Phot. J. Pinto

C. MAGARINOS TORRES: Inclusões acidophilas intranucleares (degeneração oxychromatica) na febre amarella experimental.



Cellulas hepaticas *Macacus rhesus* em córtex fixados no HELLY e corados pela hematoxylina-eosina.

Em *a* e *b*, cellulas normaes. Em *c*, *d* e *e*, phases precoces da degeneração oxychromatica. Em *f*, *g*, *h* e *i*, phases adiantadas do mesmo processo. Em *g*, figura intranuclear em "ameba". Em *h*, figura intranuclear em "borboleta".

tense in a monkey killed after 15 days, in which the oxychromatic degeneration was however very scarce.

In one monkey killed after 5 days and which carried the virus to another animal, no oxychromatic degeneration was found, slight fatty periportal infiltration being the only change observed in the liver; the oxychromatic degeneration reappeared however in the next passage.

If one takes into account that sometimes in an unbroken series of passages of the virus of yellow fever through *M. rhesus* the liver shows a normal picture, that the histopathologic changes are very variable in intensity from case to case and that the degree in which the oxychromatic degeneration is found changes according to the day of inoculation the animal is killed, the acidophilic intranuclear inclusions, in my opinion, are more liable to assure the histopathologic diagnosis of the disease induced in *M. rhesus* than any other pathological findings previously mentioned there.

The facts brought to light do not contradict the presumption that the acidophilic intranuclear inclusions are associated to the presence of the virus inside the affected cells, as stated by many writers in respect to other filterable virus diseases in which similar changes occur in the nuclei (herpes zoster, symptomatic herpes, varicella, virus III infection of rabbits).

Assuming this it is explained at once the apparent independence between oxychromatic degeneration and fatty and necrobiotic changes in the liver, the former being related to the presence and possibly, multiplication of the virus itself inside the cells, the late being in the dependence of an associated toxemia.

To Drs. BEAUREPAIRE ARAGÃO, A. MARQUES DA CUNHA and J. MUNIZ I am indebted for their courtesy in lending me tissues for histopathologic study from the monkeys used in the course of their experiments.

Fig. 1—Magnification $\times 1,150$. Section of the liver from a *M. rhesus* non-inoculated. The liver cells are seen to have a normal nucleus.

Fig. 2—Magnification $\times 1,150$. Section of the liver of a *M. rhesus* injected with *Aedes aegypti* after having fed upon the blood of yellow fever patient and killed on the 10th day of inoculation. Almost every liver cell is seen to present acidophilic intranuclear inclusions.

PLATE

Liver cells from several *M. rhesus* inoculated with the Brazilian virus of yellow fever. Many stages of the oxychromatic degeneration are represented. In *h* and *g*, "butterfly" and "entamoeba-like" intranuclear figures. Figure *e* is similar to fig. 14 of RIVER's, article on filterable viruses. Amer. Jour. Path., 1928, Vol. IX, n. 2, pg. 91.